

**Untersuchung des Metabolismus und der  
Pharmakokinetik des neuen Triazens TriN2755 in  
einer klinischen Phase-I-Studie**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Tobias Wegener

aus Marburg

November 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Inneren Klinik (Tumorforschung) in der Abteilung Pharmakologie antineoplastischer Substanzen (PAS) am Universitätsklinikum Essen der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

**1. Gutachter:** Prof. Dr. Max Scheulen

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Markus Kaiser

**Vorsitzender des Prüfungsausschusses:** Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot

**Tag der mündlichen Prüfung:** 20.04.2015

*Meinem Schatz Andrea*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungen .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Tumorthherapie mit Triazenen .....	2
1.1.1 Wirkmechanismus.....	2
1.1.2 Tumorthherapie mit Dacarbazin .....	2
1.1.2.1 Einsatzgebiet .....	3
1.1.2.2 Nebenwirkungen .....	3
1.1.3 Tumorthherapie mit Temozolomid .....	3
1.1.3.1 Einsatzgebiete .....	4
1.1.3.2 Nebenwirkungen .....	4
1.2 Metabolismus.....	5
1.2.1 Phase-I-Reaktionen .....	6
1.2.1.1 Cytochrom P450-Monooxygenasen.....	6
1.2.1.2 Cytochrom P450 unabhängige Oxidationen .....	7
1.2.2 Phase-II-Reaktionen.....	7
1.2.2.1 UDP-Glucuronosyltransferasen .....	7
1.2.2.2 Sulfotransferasen.....	8
1.2.2.3 N-Acetyltransferasen.....	8
1.2.2.4 Methyltransferasen.....	8
1.2.2.5 Aminosäuren-N-Acyltransferasen.....	9
1.2.2.6 Glutathion-S-Transferase .....	9
1.3 Pharmakokinetik .....	9
1.3.1 Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) .....	11
1.3.2 Fläche unter der ersten Momentkurve (area under the first moment curve, AUMC) .....	11
1.3.3 Mittlere Verweildauer (mean residence time, MRT).....	11
1.3.4 Clearance (CL) .....	12
1.3.5 Eliminationshalbwertszeit ( $t_{1/2}$ ).....	12
1.3.6 Verteilungsvolumen (Volume of Distribution, $V_D$ ) .....	13
1.3.7 Bioverfügbarkeit (Bioavailability, F).....	13
1.4 TriN2755 als neues Triazen.....	14
1.4.1 Struktur.....	14
1.4.2 Prälinik .....	15
1.4.3 Metabolismus von TriN2755 .....	16
1.5 Zielsetzung.....	19

<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.1	Materialien .....	20
2.1.1	Referenzsubstanzen .....	20
2.1.2	Chemikalien .....	23
2.1.3	Hergestellte Lösungen .....	24
2.1.4	Geräte .....	26
2.1.5	Verbrauchsmaterialien .....	27
2.2	Dosiseskalationsstudie .....	28
2.2.1	Studiendesign .....	28
2.2.2	Hauptzielgröße .....	31
2.2.3	Nebenzielgröße .....	31
2.2.4	Ein-/Ausschlusskriterien .....	31
2.2.5	Blutentnahmen und Plasmagewinnung .....	33
2.2.6	Sammlung von Urin .....	34
2.3	Bestimmung der Konzentration von TriN2755 und seinen Metaboliten in Plasma und Urin .....	34
2.3.1	Stammlösungen der Referenzsubstanzen .....	34
2.3.2	Qualitätskontrollproben .....	34
2.3.3	Aufarbeitung von Plasmaproben .....	35
2.3.4	Aufarbeitung von Urinproben .....	36
2.3.5	Erstellung von Kalibriergeraden .....	36
2.3.6	Chromatographie/HPLC .....	36
2.3.7	PDA-Detektion .....	37
2.3.8	MS-Detektion .....	37
2.4	In vitro Versuche an humanen Leukozyten mit TriN2755 .....	38
2.4.1	Gewinnung humaner Leukozyten .....	38
2.4.2	Inkubation mit TriN2755 .....	39
2.4.3	DNA-Extraktion .....	39
2.4.3.1	Neutrale thermische Hydrolyse .....	40
2.4.3.2	Saure thermische Hydrolyse .....	40
2.4.4	Photometrische Messung des DNA-Gehaltes .....	40
2.4.5	Fluorimetrische Bestimmung der DNA-Addukte .....	40
2.4.5.1	HPLC .....	40
2.4.5.2	Fluoreszenz-Detektion .....	41
2.4.5.3	Stammlösungen .....	41
2.4.5.4	Kalibriergeraden .....	41
2.4.6	Photometrische Bestimmung der Metabolit-Konzentrationen .....	42
2.5	Validierung .....	42
2.5.1	Linearität (Kalibriergerade) .....	42
2.5.2	Richtigkeit .....	43
2.5.2.1	Richtigkeit der MS-Detektion .....	43
2.5.2.2	Richtigkeit der PDA-Detektion .....	43
2.5.3	Präzision .....	44

2.5.3.1	Präzision der MS-Detektion.....	44
2.5.3.2	Präzision der PDA-Detektion.....	45
2.5.4	Quantifizierungs- und Detektionsgrenze.....	45
2.5.5	Selektivität/Spezifität .....	46
2.5.6	Stabilität .....	46
2.5.6.1	Stabilität in Plasma bei unterschiedlichen Lagerbedingungen	47
2.5.6.2	Stabilität vorbereiteter Proben bei unterschiedlichen Lagerbedingungen.....	47
2.5.6.3	Stabilität in Plasma nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen .....	47
2.6	Auswertung mit TopFit.....	48
2.7	Statistische Methoden .....	48
2.7.1	Deskriptive Statistik .....	49
2.7.2	Explorative Statistik .....	49
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
3.1	In vitro Versuche an humanen Leukozyten mit TriN2755 .....	49
3.1.1	Fluorimetrische Bestimmung der DNA-Addukte .....	50
3.1.2	Photometrische Messung des DNA-Gehaltes .....	51
3.1.3	Photometrische Bestimmung der Metabolit-Konzentrationen.....	52
3.2	Validierung .....	53
3.2.1	Linearität .....	53
3.2.1.1	Kalibriergeraden für die photometrische Detektion.....	53
3.2.1.2	Kalibriergeraden für die massensensitive Detektion.....	54
3.2.2	Richtigkeit .....	56
3.2.2.1	Richtigkeit der MS-Detektion .....	56
3.2.2.2	Richtigkeit der PDA-Detektion.....	57
3.2.3	Präzision.....	58
3.2.3.1	Präzision der MS-Detektion .....	58
3.2.3.2	Präzision der PDA-Detektion.....	59
3.2.4	Quantifizierungs- und Detektionsgrenze.....	60
3.2.5	Selektivität/Spezifität .....	60
3.2.6	Stabilität .....	61
3.2.6.1	Stabilität in Plasma bei unterschiedlichen Lagerbedingungen	61
3.2.6.2	Stabilität vorbereiteter Proben bei unterschiedlichen Lagerbedingungen.....	62
3.2.6.3	Stabilität in Plasma nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen .....	62
3.3	Konzentrationsbestimmung von TriN2755 und seinen Metaboliten .....	62
3.3.1	Quantifizierung im Plasma.....	62
3.3.2	Quantifizierung im Urin .....	64
3.4	Pharmakokinetische Auswertung .....	65
3.4.1	Lineare und nicht-lineare Pharmakokinetik .....	65
3.4.2	Clearance und Urinausscheidung .....	67

3.4.3	Halbwertszeit und mittlere Verweildauer .....	69
3.4.4	Verteilungsvolumen von TriN2755 .....	70
3.5	Statistische Auswertung .....	70
3.6	Neue Metaboliten .....	71
3.6.1	Einfluss der chemischen Struktur auf die UV-Absorption .....	71
3.6.2	Identifikation von Comp6 .....	72
3.6.3	Weitere methylierte Verbindungen .....	74
3.6.4	Metaboliten von Imp2 und Imp10 .....	75
3.6.4.1	Imp2-Glucuronid .....	75
3.6.4.2	Imp10-Glucuronid .....	76
3.6.4.3	Imp10-Sulfat .....	77
3.6.4.4	Imp2-Sulfat .....	77
3.6.4.5	N-Acetyl-Imp10-Sulfat .....	78
3.6.4.6	N-Acetyl-Imp10-Glucuronid .....	79
3.6.4.7	N-Acetyl-Imp10 .....	79
3.7	TriN2755 Flussdiagramm .....	80
3.7.1	Quervernetzung .....	80
3.7.2	Imp4 und Imp1 .....	80
3.7.3	Comp6 und weitere Methylester .....	81
3.7.4	Metaboliten von Imp2 und Imp10 .....	82
3.7.5	Aktualisiertes Flussdiagramm .....	83
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>85</b>
4.1	Übersicht .....	85
4.2	Messmethode .....	85
4.3	Metabolismus .....	89
4.4	Pharmakokinetik .....	96
4.5	Wirkung .....	100
4.6	Flussdiagramm .....	101
<b>5</b>	<b>Fazit/Ausblick .....</b>	<b>103</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>105</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>107</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>112</b>
9.1	Identifizierung neuer Metaboliten .....	112
9.1.1	Methylverbindungen .....	112
9.1.1.1	Methyl-Comp4 .....	112
9.1.1.2	Methyl-Comp5 .....	113
9.1.1.3	Methyl-Imp3 .....	114
9.1.1.4	Methyl-Imp7 .....	116
9.1.1.5	Methyl-Imp8 .....	117



9.1.2	Metaboliten von Imp2 .....	118
9.1.2.1	Imp2-Glucuronid .....	118
9.1.2.2	Imp2-Sulfat .....	119
9.1.3	Metaboliten von Imp10 .....	120
9.1.3.1	Imp10-Glucuronid .....	120
9.1.3.2	Imp10-Sulfat .....	121
9.1.3.3	N-Acetyl-Imp10 Derivate .....	122
9.2	Messwerte .....	123
9.2.1	Plasma .....	123
9.2.2	Urin .....	127
9.3	Pharmakokinetikdaten .....	128
9.3.1	TriN2755 .....	128
9.3.2	Comp5 .....	129
9.3.3	Comp4 .....	130
9.4	Statistik .....	131
9.4.1	Normierte Fläche unter der Kurve .....	131
9.4.2	Normierte maximale Konzentration.....	132
9.5	Patienten.....	133
9.5.1	Zeitlicher Ablauf der Studie .....	133
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>134</b>
<b>A</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>135</b>
<b>B</b>	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>136</b>
<b>C</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>137</b>

## Abkürzungen

%Ae	Mit dem Urin ausgeschiedene Wirkstoffmenge in Prozent, bezogen auf die verabreichte Dosis
ACN	Acetonitril
Ae	Amount excreted (in urine) (mit dem Urin ausgeschiedene Wirkstoffmenge)
AIC	Aminoimidazol-carboxamid
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve)
AUMC	Area under the first moment curve (Fläche unter der ersten Momentkurve)
CL	Clearance
CL <sub>R</sub>	renale Clearance
CL <sub>tot</sub>	totale Clearance
C <sub>max</sub>	maximale Konzentration
CMV	Cytomegalievirus
CoA	Coenzym A
Comp	compound (Verbindung)
CTC	Common Toxicity Criteria (Allgemeine Toxizitätskriterien)
CYP	Cytochrom P450
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMB	Data Safety Monitoring Board (Gremium zur Überwachung der Patientensicherheit)
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECOG	Index der Eastern Cooperative Oncology Group zur Beurteilung der Lebensqualität
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FDA	U.S. Food and Drug Administration (US-amerikanische Behörde für Lebensmittel- und Arzneimittelsicherheit)
GCP	Good Clinical Practice („Gute klinische Praxis“)
GSH	Glutathion bzw. $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinglycin
HBsAG	hepatitis B surface antigen (Hepatitis B Oberflächenprotein)
HCV	Hepatitis-C-Virus
HFBA	Heptafluorobutyric Acid (Heptafluorbuttersäure)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

HLB	Hydrophilic-lipophilic-balanced (ausgeglichenes Verhältnis zwischen lipophilen und hydrophilen Anteilen)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-flüssigchromatographie)
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (Internationale Konferenz zur Harmonisierung der Prüfanforderungen im Arzneimittelbereich)
Imp	impurity (Verunreinigung)
KG	Körpergewicht
LC/MS	Flüssigchromatografie mit massenspektrometrischer Detektion
LLQ	lower limit of quantification (untere Quantifizierungsgrenze)
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
MeOH	Methanol
MG	Methylguanin
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MRT	Mean residence time (mittlere Verweildauer)
MS	Massenspektrometer
MTD	Maximum Tolerated Dose (Maximal Tolerierte Dosis)
MTIC	Monomethyl-triazeno-imidazol-carboxamid
n.a.	nicht auswertbar
n.b.	nicht bestimmt/ nicht bestimmbar
N <sup>7</sup> -MG	N <sup>7</sup> -Methylguanin
NAT	N-Acetyltransferase
nIE	nach Infusionsende
nIS	nach Infusionsstart
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level (höchste Dosis ohne erkennbaren schädlichen Einfluss)
NYHA	Schema der New York Heart Association zur Einteilung von Herzerkrankungen nach Stadien
O <sup>6</sup> -MG	O <sup>6</sup> -Methylguanin
p.a.	pro analysi (zur Analyse)
PAPS	Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PAS	Pharmakologie antineoplastischer Substanzen
PBS	phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)

PDA	Photodioden-Array
puriss.	purissimum (reinst)
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (Kriterien für die Bewertung des Ansprechens der Behandlung bei soliden Tumoren)
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SIR	single ion record (Einzelionendetektion)
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
SS	steady state (Fließgleichgewicht)
$t_{1/2}$	Eliminationshalbwertszeit
TIC	total ion current (Totalionenstrom)
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
ULQ	upper limit of quantification (obere Quantifizierungsgrenze)
$V_c$	Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment
$V_{ss}$	Verteilungsvolumen im steady state
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Vermuteter Wirkmechanismus von Temozolomid und Dacarbazin (nach Darkes 2002; Rooseboom 2004) .....	5
Abb. 2	Strukturmerkmale von TriN2755 .....	15
Abb. 3	Metabolisierung von TriN2755 nach Inkubation mit Mikrosomen .....	17
Abb. 4	Erwarteter Metabolismus von TriN2755 vor Beginn der Phase-I-Studie. Der prognostizierte Anteil der einzelnen Metaboliten ist in Klammern angegeben .....	18
Abb. 5	Strukturformel von Comp4 .....	20
Abb. 6	Strukturformel von Comp5 .....	20
Abb. 7	Strukturformel von Comp6 .....	21
Abb. 8	Strukturformel von Imp1 .....	21
Abb. 9	Strukturformel von Imp2 .....	21
Abb. 10	Strukturformel von Imp3 .....	22
Abb. 11	Strukturformel von Imp4 .....	22
Abb. 12	Strukturformel von Imp7 .....	22
Abb. 13	Strukturformel von Imp8 .....	23
Abb. 14	Strukturformel von Imp10 .....	23
Abb. 15	Strukturformel von TriN2755 .....	23
Abb. 16	Fließmittelgradient zur Analyse von TriN2755 und seinen Metaboliten .....	37
Abb. 17	Fließmittelgradient zur Analyse von DNA-Addukten .....	41
Abb. 18	Fluoreszenz-Chromatogramm mit Signalen aller eingesetzten Referenzsubstanzen für die DNA-Adduktmessung .....	50
Abb. 19	Quotient aus N <sup>7</sup> -MG und Guanin in Abhängigkeit von der Inkubationszeit .....	51
Abb. 20	Ausschnitte aus dem PDA-Chromatogramm einer wässrigen Probe mit 50ng/ml jeder Referenzsubstanz inklusive dem nicht validierten Comp6 .....	54
Abb. 21	Vergleich der für Comp5 erhaltenen Signale im MS .....	55
Abb. 22	Vergleich der Basisline einer Kontrollprobe mit einer Analytlösung in Plasma bei SIR 198 .....	61
Abb. 23	Konzentrations-Zeit-Kurven mehrerer Patienten in unterschiedlichen Dosisstufen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die y-Achse logarithmiert.....	63
Abb. 24	Konzentrations-Zeit-Kurven von TriN2755 und seinen Hauptmetaboliten nach der Gabe von 6000mg TriN2755 an Patient 01-35; logarithmierte Darstellung .....	64
Abb. 25	AUCs der Patienten #01-01 bis #01-07 aufgetragen gegen die verabreichte Dosis .....	65
Abb. 26	C <sub>max</sub> -Werte der Patienten #01-01 bis #01-07 aufgetragen gegen die verabreichte Dosis .....	65

Abb. 27	Oben: Gemittelte AUC aufgetragen gegen die verabreichte Dosis mit potenziellen Ausgleichsgeraden. Unten: Linearisierte Darstellung durch doppeltlogarithmische Auftragung.....	66
Abb. 28	Oben: Gemittelte $C_{\max}$ aufgetragen gegen die verabreichte Dosis mit potenziellen Ausgleichsgeraden. Unten: Linearisierte Darstellung durch doppeltlogarithmische Auftragung.....	67
Abb. 29	Oben: Gemittelte $CL_R$ (TriN2755) aufgetragen gegen die verabreichte Dosis mit potenzieller Ausgleichsgeraden. Unten: Linearisierte Darstellung durch doppeltlogarithmische Auftragung.....	68
Abb. 30	Abhängigkeit der renalen Clearance und der renalen Ausscheidung von der verabreichten TriN2755-Dosis .....	69
Abb. 31	Gemeinsames Benzophenongrundgerüst der Referenzsubstanzen .....	71
Abb. 32	Links: Vergleich der Absorptionsspektren des gefundenen Peaks und Comp6. Rechts: Vergleich der Retentionszeiten der Peaks im SIR198.....	73
Abb. 33	Oben: Massenspektrum von Plasma von Patient #01-01, 3h nach Start der Infusion, Retentionszeit 27,3min. Unten: Massenspektrum von Comp6 in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 1µg/ml.....	74
Abb. 34	Strukturformel von Imp2-Glucuronid .....	76
Abb. 35	Strukturformel von Imp10-Glucuronid .....	77
Abb. 36	Strukturformel von Imp10-Sulfat .....	77
Abb. 37	Strukturformel von Imp2-Sulfat .....	78
Abb. 38	Strukturformel von N-Acetyl-Imp10-Sulfat.....	78
Abb. 39	Strukturformel von N-Acetyl-Imp10-Glucuronid .....	79
Abb. 40	Strukturformel von N-Acetyl-Imp10.....	79
Abb. 41	Zusammenhang zwischen TriN2755 und den gebildeten Metaboliten ohne Imp1 und Imp4 .....	80
Abb. 42	Zusammenhang zwischen Triazenen und Phenolderivaten.....	81
Abb. 43	Übersicht über die gebildeten Methylester ohne Imp1 und Imp4 .....	82
Abb. 44	Methylierungs- und Hydrolyseprodukte von TriN2755 und Comp5 .....	82
Abb. 45	Metaboliten von Imp2 und Imp10.....	83
Abb. 46	Metabolismus von TriN2755.....	84
Abb. 47	PDA-Chromatogramm aller Referenzsubstanzen mit einer Konzentration von jeweils 156,3ng/ml in Plasma. Zusätzlich wird die Zusammensetzung des Fließmittels im Verlauf der Messung dargestellt .....	87
Abb. 48	Ausschnitt aus dem MS-Chromatogramm (SIR198) einer Plasmaprobe von Patient 41, 45' nach Infusionsende, 5µl Injektionsvolumen .....	88
Abb. 49	Ausschnitt aus dem MS-Chromatogramm (SIR214) einer Plasmaprobe von Patient 41, 30' nach Infusionsende, 5µl Injektionsvolumen .....	88
Abb. 50	Hydrolyse der Triazengruppe im sauren Milieu (nach Thust 1991) .....	91
Abb. 51	Aktivierung der Triazengruppe durch CYP P450 und Freisetzung des Methyl diazoniumions am Beispiel von TriN2755 (nach Carvahlho 2000) .....	92

Abb. 52	Vergleich der Seitenkette von TriN2755 mit den Aminosäuren Serin und Glycin .....	93
Abb. 53	Dissoziationsgleichgewicht des Diazoniumions (nach Huisgen und Koch 1954, Smith 1985) .....	94
Abb. 54	Bildung von Comp6 aus TriN2755 und Diazomethan (modifiziert nach Huisgen und Koch 1954).....	94
Abb. 55	Oben: Logarithmierte Konzentrations-Zeit-Kurven von Patient #01-03 (200mg) und Pat #01-35 (6000mg). Unten: Logarithmierte Konzentrations-Zeit-Kurven von Patient #01-10 (3200mg) .....	97
Abb. 56	Oben: Massenspektrum von Plasma von Patient #01-09, 15min nach Ende der Infusion, Retentionszeit 11min. Unten: Massenspektrum von Comp4 in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 1µg/ml.....	112
Abb. 57	Vergleich der Absorptionsspektren von Comp4 und Me-Comp4 im Plasma von Patient #01-42, 5min nach Ende der Infusion .....	113
Abb. 58	Oben: Massenspektrum von Plasma von Patient #01-09, 15min nach Ende der Infusion, Retentionszeit 30,3min. Unten: Massenspektrum von Comp5 in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 1µg/ml.....	113
Abb. 59	Vergleich der Absorptionsspektren von Comp5 und Me-Comp5 im Plasma von Patient #01-42, 5min nach Ende der Infusion .....	114
Abb. 60	Oben: Massenspektrum von Plasma von Patient #01-09, 15min nach Ende der Infusion, Retentionszeit 9,6min. Unten: Massenspektrum von Imp3 in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 1µg/ml.....	114
Abb. 61	Vergleich der Absorptionsspektren von Imp3 und Me-Imp3 im Plasma von Patient #01-42, 5min nach Ende der Infusion .....	115
Abb. 62	Oben: Massenspektrum von Plasma von Patient #01-09, 15min nach Ende der Infusion, Retentionszeit 25,3min. Unten: Massenspektrum von Imp7 in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 1µg/ml.....	116
Abb. 63	Vergleich der Absorptionsspektren von Imp7 und Me-Imp7 im Plasma von Patient #01-42, 5min nach Ende der Infusion .....	116
Abb. 64	Oben: Massenspektrum von Plasma von Patient #01-09, 15min nach Ende der Infusion, Retentionszeit 11,6min. Unten: Massenspektrum von Imp8 in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 1µg/ml.....	117
Abb. 65	Vergleich der Absorptionsspektren von Imp8 und Me-Imp8 im Plasma von Patient #01-42, 5min nach Ende der Infusion .....	117
Abb. 66	Oben: Massenspektrum von Urin von Patient #01-14, Retentionszeit 16,2min. Unten: Massenspektrum von Imp2-Glucuronid in wässriger Lösung.....	118
Abb. 67	Links: Vergleich der Absorptionsspektren des gefundenen Peaks und hergestelltem Imp2-Glucuronid, Rechts: Vergleich der Retentionszeiten der Peaks im SIR270 .....	118
Abb. 68	Oben: Massenspektrum von Plasma von Patient #01-09, 15min nach Ende der Infusion, Retentionszeit 32,7min. Unten: Massenspektrum von Imp2 in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 1µg/ml.....	119

Abb. 69	Vergleich der Absorptionsspektren des gefundenen Peaks und Imp2 .....	119
Abb. 70	Oben: Massenspektrum von Plasma von Patient #01-09 15min nach Ende der Infusion, Retentionszeit 3,4min; Unten: Massenspektrum von Imp10-Glucuronid in wässriger Lösung .....	120
Abb. 71	Links: Vergleich der Absorptionsspektren des gefundenen Peaks und hergestelltem Imp10-Glucuronid, Rechts: Vergleich der Retentionszeiten der Peaks im SIR214 .....	120
Abb. 72	Oben: Massenspektrum von Urin von Patient #01-14, Retentionszeit 7,5min. Unten: Massenspektrum von Imp10 in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 1µg/ml .....	121
Abb. 73	Vergleich der Absorptionsspektren des gefundenen Peaks und Imp10 .....	121
Abb. 74	Massenspektren von Urin von Patient #01-14 bei 10,4min (oben), 3,8min (Mitte) und 9,4min (unten) .....	122
Abb. 75	Vergleich der Absorptionsspektren der drei N-acetylierten Imp10 Derivate.....	122
Abb. 76	Darstellung der Teilnahmezeiträume der einzelnen Patienten getrennt nach Arm A (oben) und Arm B (unten) .....	133

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Demographische Daten der in die Studie aufgenommenen Patienten .....	28
Tab. 2.2	Geplante Dosissteigerungen (in mg) in Arm A und Übergang von der beschleunigten Eskalationsphase (weiß) zur Standard-Eskalationsphase (grau) in Abhängigkeit vom Schweregrad auftretender Nebenwirkungen.....	30
Tab. 2.3	Geplante Dosissteigerungen (in mg) in Arm B und Übergang von der beschleunigten Eskalationsphase (weiß) zur Standard-Eskalationsphase (grau) in Abhängigkeit vom Schweregrad auftretender Nebenwirkungen.....	30
Tab. 2.4	Zeitpunkte der Blutentnahmen .....	34
Tab. 2.5	Einzelionendetektion der Referenzsubstanzen.....	38
Tab. 2.6	Ausgangslösung der Verdünnungsreihe.....	42
Tab. 2.7	Zusammensetzung der Lösung für die Bestimmung von Richtigkeit, Präzision und ULQ.....	44
Tab. 2.8	Zusammensetzung der Lösungen für die Bestimmung der Präzision mit massenspektrometrischer Detektion .....	45
Tab. 2.9	Zusammensetzung der Lösungen für die Bestimmung der Präzision mit photometrischer Detektion .....	45
Tab. 3.1	Konzentrationen der in den DNA-Hydrolysaten gemessenen DNA-Basen .....	51
Tab. 3.2	Konzentrationen im Zellüberstand nach Inkubation mit TriN2755 .....	52
Tab. 3.3	Abnahme der prozentualen Wiederfindung im Laufe der Inkubation .....	53
Tab. 3.4	Durch lineare Regression errechnete Konzentrationen der Kalibrierstandards nach photometrischer Detektion.....	53



Tab. 3.5	Durch lineare Regression errechnete Konzentrationen der Kalibrierstandards nach massenspektrometrischer Detektion .....	56
Tab. 3.6	Ergebnis der Bestimmung der Richtigkeit nach MS-Detektion.....	57
Tab. 3.7	Ergebnis der Bestimmung der Richtigkeit nach PDA-Detektion .....	57
Tab. 3.8	Richtigkeit und Präzision von ULQ-Proben .....	58
Tab. 3.9	Ergebnis der Bestimmung der Präzision nach MS-Detektion .....	59
Tab. 3.10	Ergebnis der Bestimmung der Präzision nach PDA-Detektion .....	59
Tab. 3.11	Clearance und kumulierte prozentuale Ausscheidung von TriN2755 .....	69
Tab. 3.12	Halbwertszeit und mittlere Verweildauer von TriN2755, Comp5 und Comp4.....	70
Tab. 3.13	Auf das Körpergewicht normierte und unnormierte Verteilungsvolumina von TriN2755 im steady state .....	70
Tab. 3.14	Ergebnisse der Signifikanztests für $C_{\max}$ und AUC .....	71
Tab. 3.15	Übersicht über die Seitenketten der Referenzsubstanzen und die resultierenden Absorptionsmaxima.....	72
Tab. 9.1	Im Rahmen der Studie mittels PDA und MS gemessene TriN2755- Konzentrationen im Plasma [ng/ml].....	123
Tab. 9.2	Im Rahmen der Studie mittels PDA und MS gemessene Comp5- Konzentrationen im Plasma [ng/ml].....	124
Tab. 9.3	Im Rahmen der Studie mittels PDA und MS gemessene Comp4- Konzentrationen im Plasma [ng/ml].....	125
Tab. 9.4	Im Rahmen der Studie mittels PDA und MS gemessene TriN2755- Konzentrationen im Urin [ng/ml].....	127
Tab. 9.5	Für TriN2755 berechnete Pharmakokinetikparameter.....	128
Tab. 9.6	Für Comp5 berechnete Pharmakokinetikparameter.....	129
Tab. 9.7	Für Comp4 berechnete Pharmakokinetikparameter.....	130
Tab. 9.8	Auf Dosis/Körpergewicht normierte AUC der männlichen Patienten.....	131
Tab. 9.9	Auf Dosis/Körpergewicht normierte AUC der weiblichen Patienten.....	131
Tab. 9.10	Auf Dosis/Körpergewicht normierte $C_{\max}$ der männlichen Patienten.....	132
Tab. 9.11	Auf Dosis/Körpergewicht normierte $C_{\max}$ der weiblichen Patienten.....	132



# 1 Einleitung

Laut Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) aus dem Jahr 2008 starben weltweit etwa 7,6 Millionen Menschen an Krebs. Gleichzeitig wurde die Zahl der Neuerkrankungen auf 12,7 Millionen beziffert. In Europa lassen sich 20% aller Todesfälle auf Krebserkrankungen zurückführen, die damit nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache darstellen. Von etwa einem Viertel aller neuauftretenden Krebsfälle waren Europäer betroffen, was in 2008 1,7 Millionen Todesfälle zur Folge hatte. In aktuellen Hochrechnungen geht die WHO davon aus, dass im Jahr 2030 weltweit etwa 13,1 Millionen Menschen an Krebserkrankungen sterben werden (World Health Organisation 2012).

Bei vielen Tumorerkrankungen hängt die erfolgreiche Behandlung von dem Stadium ab, in welchem die Erkrankung entdeckt wird. Je früher die Diagnose gestellt wird, desto größer sind die Heilungschancen, sofern kurative Behandlungsoptionen bestehen. Meist erfolgt die Diagnose jedoch erst in einem fortgeschrittenen Stadium, in dem sich bereits Metastasen gebildet haben. Selbst mit aktuellen Therapien lassen sich diese Erkrankungen nur kurzzeitig aufhalten. Neben neuen Zytostatika mit spezifischen molekularen Zielstrukturen, spielen klassische Chemotherapeutika bei der Behandlung von Patienten mit Krebs im fortgeschrittenen Stadium noch immer eine wichtige Rolle. Dies ist auch der Grund für die Suche nach Substanzen, die zwar auf bekannten Wirkmechanismen beruhen, aber trotzdem spezifischer wirken und gleichzeitig weniger Nebenwirkungen verursachen.

Von den klassischen Zytostatika sind Verbindungen aus der Gruppe der Alkylantien am längsten bekannt. Zu ihnen zählen die bifunktional wirkenden Stickstoff-Lost-Derivate wie Cyclophosphamid, die eine Inter- oder Intrastrangvernetzung zweier DNA-Einzelstränge herbeiführen. Ähnlich wirken Vertreter der Alkylsulfonate und Nitrosoharnstoffe wie z.B. Busulfan bzw. Carmustin, die zu einer Interstrangvernetzung führen. Im Gegensatz dazu stehen die Triazene, die teilweise auch als nicht-klassische Alkylantien bezeichnet werden. Sie wirken monofunktional und führen nicht zu Vernetzungen, sondern alkylieren einzelne Atome der DNA-Basen. Prominente Vertreter sind Dacarbazin, das nun seit fast 40 Jahren den Goldstandard bei der Behandlung metastasierter Melanome darstellt und Temozolomid, das als liquorgängiges Prodrug auch gegen Astrozytome und Glioblastome eingesetzt werden kann.

## 1.1 Tumorthherapie mit Triazenen

### 1.1.1 Wirkmechanismus

Wie bereits erwähnt, beruht die zytotoxische Wirkung der Triazene auf der Entstehung von methylierten DNA-Basen, den sogenannten DNA-Addukten. Ihre zytotoxische Wirkung sowie das Ausmaß, in dem die unterschiedlichen Addukte gebildet werden, unterscheiden sich zum Teil erheblich (Shrivastav et al. 2010). Eines der am häufigsten gebildeten Addukte ist das N<sup>7</sup>-Methylguanin (N<sup>7</sup>-MG), das auch unter physiologischen Bedingungen durch Reaktion der DNA mit körpereigenen Substanzen entstehen kann (Rydberg et Lindahl 1982), selbst aber kaum zytotoxisch wirkt. Im Gegensatz dazu kann N<sup>3</sup>-Methylguanin, das zwar auch unter physiologischen Bedingungen gebildet wird, die Replikation behindern (Shrivastav et al. 2010). Beide können jedoch entweder durch Hydrolyse oder durch die körpereigene Basenexzisionsreparatur aus dem DNA-Strang herausgelöst werden. Dabei hinterlassen sie abasische Stellen, die, wenn sie nicht durch weitere Reparaturenzyme aufgefüllt werden, zu Mutationen der DNA führen können (Hoeijmakers 2001). Für die zytotoxische Wirkung der Triazene wird vor allem die Entstehung von O<sup>6</sup>-Methylguanin (O<sup>6</sup>-MG) verantwortlich gemacht. Wird die Methylgruppe in O<sup>6</sup>-Position nicht durch die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) entfernt, führt die Anwesenheit von O<sup>6</sup>-Methylguanin im Laufe der Replikation zu einer Basenfehlpaarung mit Thymin. Diesen Fehler versucht die Basenfehlpaarungsreparatur zu beheben. Wird dabei allerdings Thymin entfernt und O<sup>6</sup>-Methylguanin verbleibt im gegenüberliegenden Strang, erfolgt die erneute Paarung mit Thymin. Mehrere erfolglose Durchgänge dieses „futile repair cycles“ führen zum Zellzyklus-Arrest und lösen schließlich die Apoptose der Zelle aus (Marchesi et al. 2007).

### 1.1.2 Tumorthherapie mit Dacarbazin

Dacarbazin wurde von der Firma Bayer entwickelt und erstmals im Jahr 1975 in den USA zugelassen. Seitdem findet es immer noch häufig, auch in Kombination mit anderen Zytostatika, Anwendung bei verschiedenen Tumorentitäten.

Bei Dacarbazin handelt es sich um eine inaktive Vorstufe, die erst in der Leber durch die Cytochrom P450-Enzyme (CYP) 1A1, 1A2 und 2E1 (Reid et al. 1999) in das aktive Monomethyl-triazeno-imidazol-carboxamid (MTIC) umgewandelt wird. Dieses zerfällt zum inaktiven Aminoimidazol-carboxamid (AIC) und setzt dabei ein Methyldiazoniumion frei, welches in der Lage ist seine Methylgruppe auf RNA- und DNA-Basen zu übertragen (s. Abb. 1).

#### 1.1.2.1 Einsatzgebiet

Als Monotherapie wird Dacarbazin häufig zur Behandlung des metastasierten malignen Melanoms eingesetzt. Da es nach oraler Gabe nicht resorbiert werden kann, muss die Applikation intravenös erfolgen. Je nach Therapieschema erhalten Patienten entweder eine hochdosierte Infusion am ersten Behandlungstag oder Bolusinjektionen bzw. Kurzzeitinfusionen an mehreren aufeinander folgenden Tagen, die jeweils in regelmäßigen Intervallen wiederholt werden.

In Kombinationstherapie wird es dagegen vor allem zur Behandlung von fortgeschrittenen Weichteilsarkomen und fortgeschrittenem Morbus Hodgkin eingesetzt. Trotz seiner geringen Liquorgängigkeit ist es ebenfalls bei Neuroblastomen und einigen Hirntumoren wirksam (Ackermann et al. 2004).

#### 1.1.2.2 Nebenwirkungen

Die Therapie mit Dacarbazin führt bei vielen Patienten zu Anorexie, Übelkeit und sehr starkem Erbrechen. Wie bei vielen Zytostatika verursacht es Alopezie und wirkt knochenmarksupprimierend, wodurch die Leistung des blutbildenden Systems negativ beeinflusst wird. Meistens geschieht dies jedoch zeitverzögert und in Abhängigkeit der verabreichten Dosis. Gelegentlich finden sich aufgrund einer Nierenfunktionsstörung erhöhte Spiegel harnpflichtiger Substanzen im Blut. Auch eine meist ungefährliche Erhöhung der Leberenzymwerte ist möglich. Zusammen mit grippeartigen Symptomen, Fieber und einer Eosinophilie kann dies jedoch auch ein Hinweis auf das Budd-Chiari-Syndrom sein, bei dem es durch den Verschluss intrahepatischer Venen zur Lebernekrose kommt, die zum Tod führen kann (Orfanos et al. 2002).

#### 1.1.3 Tumorthherapie mit Temozolomid

Temozolomid wurde sehr viel später entwickelt und kam erst 1999 auf den US-amerikanischen Markt. Gegenüber Dacarbazin gibt es zwei entscheidende Vorteile. Temozolomid ist oral verfügbar und wird deswegen in verkapselter Form verabreicht. Außerdem überwindet es die Blut-Hirn-Schranke und eignet sich somit besonders zur Therapie von Hirntumoren.

Die Aktivierung erfolgt nicht wie bei Dacarbazin über Cytochrom P450, sondern bei physiologischem pH-Wert im Blut durch Hydrolyse. Analog zum Dacarbazin entsteht hieraus als aktive Form ebenfalls MTIC (s. Abb. 1), so dass sich die Wirkmechanismen nach der Aktivierung gleichen (Rooseboom et al. 2004).

#### 1.1.3.1 Einsatzgebiete

Anwendung findet Temozolomid in der Erstlinientherapie von Glioblastoma multiforme zusammen mit gleichzeitiger Radiotherapie. Nach maximal 7 Wochen täglicher Einnahme erfolgt der Wechsel zur Monotherapie ohne zusätzliche Bestrahlung. Ähnlich der Therapie mit Dacarbazin erfolgt dabei die Verabreichung der Therapie jeweils nur an den ersten 5 Tagen eines Therapiezyklus gefolgt von 23 behandlungsfreien Tagen. Nach diesem Schema werden u.a. auch rezidivierende und progrediente Gliome behandelt. Alternativ erfolgen Behandlung und Behandlungspause für jeweils 7 Tage im Wechsel. Aufgrund der Ähnlichkeit zu Dacarbazin kann es als Behandlungsalternative auch bei dessen Einsatzgebieten eingesetzt werden.

#### 1.1.3.2 Nebenwirkungen

Sehr häufig treten Übelkeit, Erbrechen, Anorexie und Obstipation und damit verbundener Gewichtsverlust auf. Dazu kommen oft Kopfschmerzen und Krampfanfälle. Durch die Knochenmarksuppression kommt es wie bei Dacarbazin zu Blutbildveränderungen. Teilweise treten jedoch schwerwiegende Neutro- und Thrombozytopenien auf, die in einigen Fällen das Absetzen von Temozolomid erfordern.

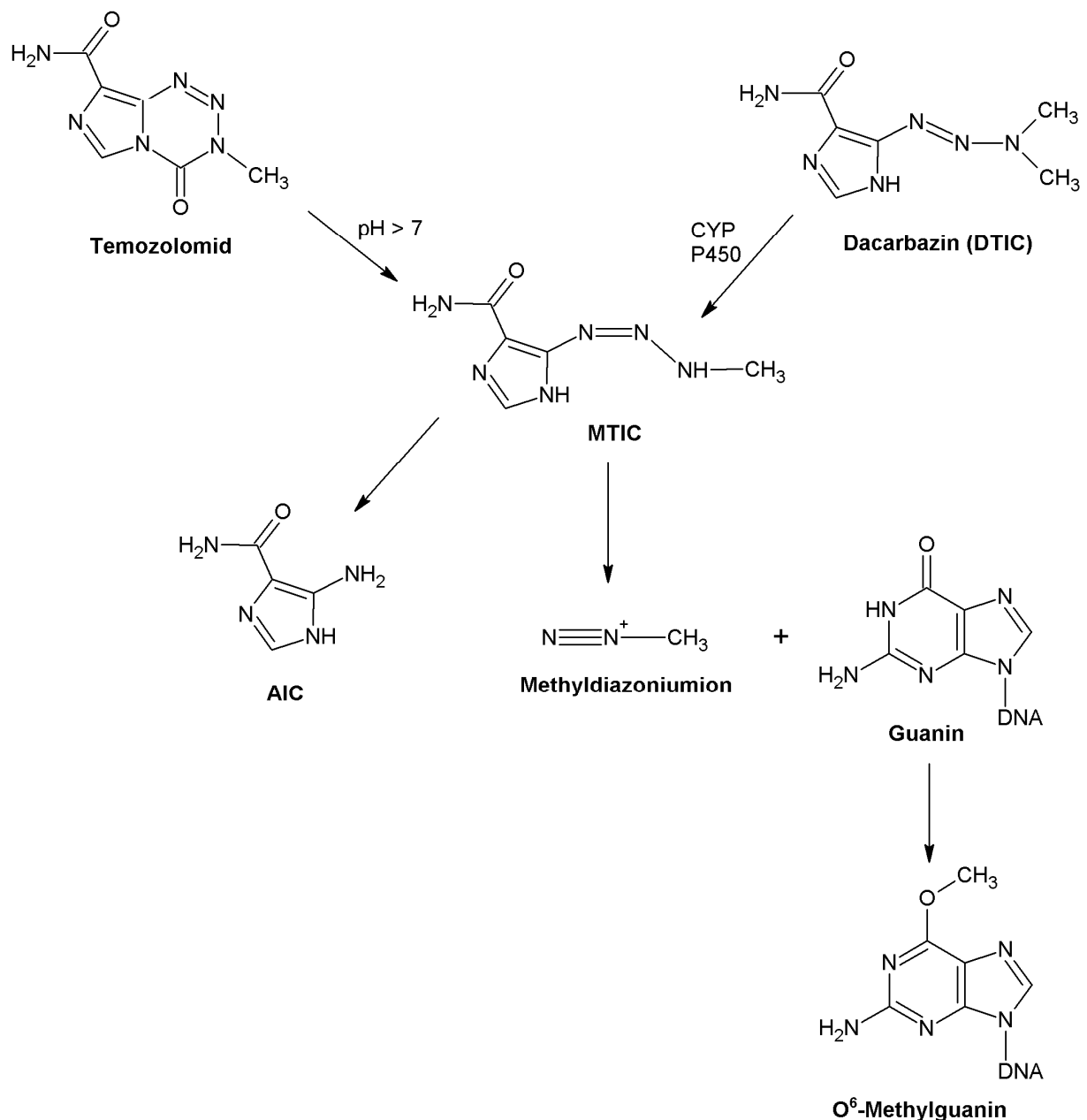


Abb. 1 Vermuteter Wirkmechanismus von Temozolomid und Dacarbazin (nach Darkes 2002; Rooseboom 2004)

## 1.2 Metabolismus

Die metabolische Umwandlung von aufgenommenen Fremdstoffen und körpereigenen Substanzen ist ein essentieller Schritt des menschlichen Stoffwechsels, da so die Exkretion von Fremdstoffen und Abbauprodukten in vielen Fällen erst ermöglicht wird. Der Metabolismus von Xenobiotika wird als Biotransformation bezeichnet und besteht im Wesentlichen aus zwei Phasen, in deren Rahmen lipophile Substanzen in hydrophilere Verbindungen umgewandelt werden, welche dadurch leichter ausscheidbar werden. Die enzymatischen Reaktionen der Phase-I dienen dabei der Funktionalisierung und ermöglichen in Phase-II die Konjugation mit körpereigenen Stoffen. In einem, teilweise auch als Phase-III

bezeichneten, letzten Schritt werden die gebildeten Substanzen dann hauptsächlich renal oder biliär ausgeschieden.

Das Ziel einen Fremdstoff auf diese Weise zu inaktivieren bzw. zu detoxifizieren wird dabei nicht immer erreicht. Manche als „Prodrugs“ bezeichneten Arzneistoffe werden im Rahmen der Biotransformation erst aktiviert oder in eine wirksamere Form überführt. Entstehen jedoch aus primär unschädlichen Substanzen toxische Metabolite, spricht man auch von Biotoxifizierung.

### 1.2.1 Phase-I-Reaktionen

Ein Großteil der Phase-I-Reaktionen wird von Oxidasen und Oxygenasen vermittelt, von denen die Monooxygenasen des Cytochrom P450-Systems für die Biotransformation von Xenobiotika am wichtigsten sind. Die in Phase-I ablaufenden Reaktionen sind im Wesentlichen Oxidationen. Daneben dienen aber auch Reduktionen und Hydrolysen der Funktionalisierung.

Hydrolytische Spaltungen werden von Esterasen katalysiert, die ubiquitär im Körper und auch in Darmbakterien vorkommen. Neben Estern und Amiden können auch Glykoside und Glucuronide gespalten werden.

Zu den Reduktionen zählen nur einige spezielle Reaktionen. Sie werden z.B. durch die Alkoholdehydrogenase katalysiert, die jedoch auch an Oxidationen beteiligt ist.

#### 1.2.1.1 Cytochrom P450-Monooxygenasen

Die Cytochrom P450-Enzyme sind Hämoproteine, die in vielen Organen vorhanden sind. Der weitaus größte Anteil befindet sich in der Leber, gebunden an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Im Menschen wurden bereits 57 Isoformen identifiziert (Redlich et al. 2008). Zur Unterscheidung erfolgt die Einordnung in Familien und Subfamilien sowie die Nummerierung der Isoenzyme. Besondere Relevanz für den Metabolismus von Fremd- bzw. Arzneistoffen haben die Enzyme der Familien 1 – 3. Eine zentrale Rolle spielt das Isoenzym CYP3A4, das mit einem Anteil von ca. 40% in der Leber am stärksten exprimiert wird (Paine 2006) und aufgrund seiner geringen Substratspezifität an vielen Reaktionen beteiligt ist. Die CYP-Enzyme sind auch für den sog. First-Pass-Effekt mitverantwortlich, der vor allem bei oral eingenommenen Arzneistoffen zum tragen kommt. Diese werden nach der Aufnahme über den Darm über die Pfortader zuerst zur Leber transportiert, bevor sie weiter im Körper verteilt werden. Bei dieser ersten Passage der Leber kann je nach aufgenommener Substanz durch die dort vorhandenen Enzyme bereits eine Inaktivierung stattfinden oder ein Prodrug aktiviert werden.



Einige Arznei- und Pflanzeninhaltsstoffe sind in der Lage einzelne CYP-Isoenzyme zu inhibieren oder deren vermehrte Bildung zu induzieren. Dies kann im Folgenden Einfluss auf den Metabolismus der auslösenden Substanz selbst, aber auch auf alle anderen, von diesem CYP-Isoenzym umgesetzten, Substrate haben.

Abseits der unterschiedlichen Substratspezifität läuft die Reaktion an den eisentragenden katalytischen Zentren nach einem identischen Mechanismus ab, bei dem ein Sauerstoffatom aus einem Sauerstoffmolekül in das Substrat eingebaut wird. Durch das breite Spektrum an möglichen Substraten sind viele verschiedene Oxidationsreaktionen möglich, wie die Oxidation von Aldehyden, Alkoholen, aromatischen Aminen und aliphatischen Kohlenwasserstoffketten. Des Weiteren werden oxidative Desaminierungen, O- und N-Desalkylierungen sowie die Hydroxylierung von Aromaten katalysiert.

#### 1.2.1.2 Cytochrom P450 unabhängige Oxidationen

Neben den von CYP-Enzymen katalysierten Oxidationen können einige Substanzen auch über andere Enzyme oxidativ verändert werden. Dazu zählen u.a. die Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen, die in der Leber Alkohole zu Aldehyden bzw. zu Säuren umsetzen, Monoaminoxidasen, die vor allem primäre Amine oxidieren und Flavin-abhängige Monooxygenasen, die den CYP-Enzymen ähnlich sind, aber ein geringeres Substratspektrum aufweisen (FIZ Chemie 2012).

#### 1.2.2 Phase-II-Reaktionen

Wie bereits erwähnt, schließt sich die Konjugation der entstandenen, funktionellen Gruppen an die Funktionalisierungsreaktionen der Phase-I an. Bei bereits vorhandenen funktionellen Gruppen ist dies auch ohne vorherige Modifikation möglich. Katalysiert werden diese Reaktionen von Transferasen, die Amino-, Thiol- und Carboxygruppen sowie alkoholische und phenolische Hydroxygruppen modifizieren können. Die entstandenen Konjugate weisen eine höhere Wasserlöslichkeit als die Ausgangsverbindungen auf und können anschließend renal oder biliär ausgeschieden werden. Allerdings kann es auch im Phase-II-Metabolismus vorkommen, dass die Konjugation nicht zur Inaktivierung eines aktiven Fremdstoffes führt, sondern das Konjugat ebenfalls aktiv ist. So führt beispielsweise die Bildung des Metaboliten Morphin-6-glucuronid aus Morphin sogar zu einer gesteigerten Wirkpotenz (Massi et al. 1994).

##### 1.2.2.1 UDP-Glucuronosyltransferasen

Die Uridin-5'-diphosphat-Glucuronosyltransferasen (UGT) sind eine Gruppe von Isoenzymen, die in die Familien UGT1 und UGT2 eingeteilt werden. Es handelt sich um

membranebundene Enzyme, die vor allem in Leber, Niere und Darm zu finden sind. Dort übertragen sie UDP-Glucuronsäure (aktivierte Glucuronsäure) auf ein breites Spektrum von Substraten. Zielstrukturen sind meist Alkohole, Phenole und Amine. Die Übertragung kann aber auch auf Thiol- und Carboxygruppen erfolgen. Aus diesem Grund unterscheiden sich die entstehenden Reaktionsprodukte in ihrer Hydrolysestabilität und können beispielsweise pH-Wert abhängig wieder gespalten werden (Mutschler et al. 2008). Aus Glucuroniden, die biliär ausgeschieden werden, kann außerdem durch bakterielle  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität der Intestinalflora die Ausgangsverbindung wieder freigesetzt werden und in den enterohepatischen Kreislauf eintreten (Tukey et Strassburg 2000).

#### 1.2.2.2 Sulfotransferasen

Sulfotransferasen liegen membrangebunden und im Cytosol gelöst vor. Ihr Cosubstrat ist 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), auch aktivierte Schwefelsäure genannt, von der die Sulfatgruppe auf Phenole, Alkohole und Amine übertragen wird. Da der Gehalt an verfügbarem PAPS limitiert ist und dessen Synthese von dem zur Verfügung stehendem Sulfat abhängig ist, kann dies zur Erschöpfung der Konjugationsreaktion führen (Klaassen et Boles 1997).

#### 1.2.2.3 N-Acetyltransferasen

Von den N-Acetyltransferasen (NAT) sind bisher zwei Isoenzyme bekannt. Während NAT1 ubiquitär vorkommt, findet man NAT2 vermehrt im Gastrointestinaltrakt und in der Leber. Für gewöhnlich werden durch N-Acetyltransferasen Acetylgruppen von Acetyl-Coenzym A auf Alkyl- und Arylamine übertragen. Diese Reaktion führt meist zur Inaktivierung einer aktiven Verbindung, allerdings wird die Wasserlöslichkeit vermindert (Mutschler et al. 2008). Gegenteilige Reaktionen sind aber auch hier möglich, da durch individuelle Polymorphismen der metabolisierenden Enzyme die Geschwindigkeit der Acetylierung reduziert und die Oxidation durch CYP-Enzyme gleichzeitig erhöht sein kann. In diesem Fall werden Arylamine erst zu Hydroxylaminen oxidiert. Die darauffolgende Acetylierung der Hydroxygruppe führt jedoch zu instabilen Verbindungen, die im Verdacht stehen Blasenkarzinome auszulösen (Sabbioni et Jones 2002).

#### 1.2.2.4 Methyltransferasen

Methylierungsreaktionen laufen nur in vergleichsweise wenigen Fällen ab. Vom Cosubstrat S-Adenosyl-L-methionin (SAM) wird dabei eine Methylgruppe auf Heteroatome übertragen. Im Metabolismus von Katecholaminen und strukturverwandten Arzneistoffen gegen Morbus Parkinson spielt die Catechol-O-Methyltransferase eine wichtige Rolle, da sie durch die O-

Methylierung von Hydroxygruppen eine inaktivierende Funktion hat. Die Enzyme Thiopurin-S-methyltransferase und Thiolmethyltransferase übertragen die Methylgruppe auf aliphatische bzw. aromatische Substrate mit Thiolgruppe und sind essentiell für den Metabolismus von Arzneistoffen mit Thiopurinstruktur.

#### 1.2.2.5 Aminosäuren-N-Acyltransferasen

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Löslichkeit von Fremdstoffen mit Carboxygruppe ist die Konjugation mit Aminosäuren. Dabei wird nicht wie bei den oben genannten Reaktionen das Cosubstrat aktiviert, sondern die zu konjugierende Substanz selbst. Das Enzym CoA-Ligase überträgt Coenzym A (CoA) auf die Carboxygruppe. Der so entstandene Thioester ist schließlich das Substrat für Aminosäuren-N-Acyltransferasen, die hauptsächlich in Leber und Niere vorkommen (Knights et al. 2007). Sie bilden das Konjugat durch Austausch von CoA gegen die Aminosäure Glycin.

#### 1.2.2.6 Glutathion-S-Transferase

Die Glutathion-S-Transferasen sind cytosolisch und mikrosomal vorkommende Enzyme, von denen beim Menschen 20 verschiedene Isoenzyme bekannt sind (Mutschler et al. 2008). Sie sind ubiquitär zu finden, liegen aber in der Leber in besonders großer Menge vor. Ihre Substrate sind elektrophile und damit potenziell toxische Verbindungen. Bei der Konjugation verwendeten Glutathion (GSH, auch  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycine) handelt es sich um ein Tripeptid bestehend aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin. Durch weitere enzymatische Reaktionen werden Glycin und Glutamin nach der Konjugation wieder abgespalten. Das verbleibende Cystein wird häufig abschließend von einer N-Acetyltransferase acetyliert (FIZ Chemie 2012). Wie auch bei der Sulfatierung kann der in den Zellen gespeicherte Vorrat an GSH durch große Mengen der zu konjugierenden Substanz erschöpft werden. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Überdosierung von Paracetamol. Sobald der in der Leber gebildete, reaktive Metabolit N-Acetyl-p-benzochinonimin nicht mehr mittels GSH detoxifiziert werden kann, reagiert dieser mit hepatozytären Proteinen, was im schlimmsten Fall zu einer letalen Leberzellnekrose führt (Black 1984).

### 1.3 Pharmakokinetik

Die Wechselwirkungen zwischen Organismus und einem Wirkstoff sind der zentrale Forschungsgegenstand der Pharmakologie. Innerhalb der Pharmakologie wird zwischen pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Prozessen unterschieden. Die Wirkung, die eine Substanz auf den Körper hat, d.h. der Effekt, den sie am Wirkort auslöst, wird durch die Pharmakodynamik beschrieben. Die Pharmakokinetik hingegen charakterisiert alle Prozesse,

die vom Einbringen des Stoffes in den Körper, bis hin zu seiner Wirkung ablaufen. Diese werden unter dem Akronym LADME zusammengefasst. Es setzt sich aus den Begriffen Liberation (Freisetzung), Absorption (Aufnahme), Distribution (Verteilung), Metabolismus und Elimination bzw. Exkretion (Ausscheidung) zusammen (FIZ Chemie 2012). Sofern er nicht bereits in gelöster Form vorliegt, muss ein Arzneistoff aus der Arzneiform erst freigesetzt und gelöst werden. Anschließend kann er im Darm bzw. vom Ort seiner Anwendung resorbiert werden und in die Blutbahn übergehen. Im Falle einer intravenösen Verabreichung fallen diese ersten beiden Schritte weg. Vom Blut aus erfolgt die Verteilung in das Gewebe und andere Körperflüssigkeiten. Die im Rahmen des Metabolismus ablaufenden Reaktionen und Vorgänge wurden bereits geschildert (s. Kap. 1.2). Gleichzeitig werden die gebildeten Metaboliten und auch der Wirkstoff in unveränderter Form ausgeschieden. Die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich über die Nieren mit dem Urin oder per Gallenflüssigkeit und Dünndarm mit dem Stuhl. Da diese Prozesse nicht nur qualitativ betrachtet werden, sondern auch die Konzentrationsverläufe zu jedem Zeitpunkt nach der Applikation dargestellt werden, bedient sich die Pharmakokinetik zu deren Charakterisierung sogenannter Kompartiment-Modelle. Da sie der Vereinfachung dienen, lassen sie sich meist nicht direkt mit anatomischen Strukturen gleichsetzen. Im einfachsten dieser Modelle, dem Ein-Kompartiment-Modell, wird der gesamte Körper als ein einziger Raum (Kompartiment) betrachtet, in dem sich ein Wirkstoff verteilen kann und aus dem er nur über einen Weg wieder ausgeschieden werden kann. In komplexen Zwei- oder Mehr-Kompartiment-Modellen geht man jedoch von einem zentralen Kompartiment aus, das in den meisten Fällen dem Blut- bzw. Plasmavolumen entspricht. Da der Wirkort einer Substanz für eine Konzentrationsmessung oft nicht zugänglich ist, werden die Wirkstoffkonzentrationen stattdessen im Plasma bestimmt. Dabei wird davon ausgegangen, dass Konzentrationsänderungen im Plasma gleichermaßen auch im Gewebe stattgefunden haben (Gunaratna C 2001). Organe, Gewebe und Körperflüssigkeiten, in die der Wirkstoff aus dem Plasma übergeht, werden zu einem oder mehreren peripheren Kompartimenten zusammengefasst. Strukturen, in denen der Wirkstoff längere Zeit verweilt, z.B. das Fettgewebe, werden als tiefes Kompartiment bezeichnet. Sofern keine Ausscheidung oder Metabolismus erfolgt, sind alle Verteilungsprozesse reversibel und können durch Geschwindigkeitskonstanten beschrieben werden. Grundlage für die pharmakokinetische Beschreibung eines Wirkstoffes sind zeitlich aufeinander folgende Bestimmungen der Wirkstoffkonzentration in Blut und Urin. Die aus diesen Daten ermittelbaren Parameter werden im Folgenden erläutert.

### 1.3.1 Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC)

Als AUC wird die Fläche unter einer Konzentrations-Zeit-Kurve bezeichnet. Wird nach der Verabreichung eines Arzneistoffes dessen Konzentration im Blut zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt, ergibt sich die Konzentrations-Zeit-Kurve durch das Auftragen der gemessenen Konzentrationen (C) gegen die Abnahmezeitpunkte (t). Die resultierende AUC verhält sich proportional zu dem Teil der verabreichten Dosis, der unverändert in den systemischen Blutkreislauf gelangt ist. Dabei spielt es keine Rolle auf welchem Weg der Wirkstoff appliziert wurde (Aktories et al. 2009). Beschrieben wird die AUC durch folgende Formel:

$$AUC = \int_0^{\infty} C \, dt$$

Die AUC kann durch die Trapezregel abgeschätzt werden. Die gesamte Fläche wird dazu in beliebig viele Trapeze aufgeteilt, deren Flächen durch jeweils zwei Zeitwerte und den zugehörigen Konzentrationswerten berechnet werden können. Anschließend werden die Flächen aller Trapeze addiert.

### 1.3.2 Fläche unter der ersten Momentkurve (area under the first moment curve, AUMC)

Die erste Momentkurve ist die Darstellung des Produktes aus Zeit und gemessener Konzentration aufgetragen gegen die Zeit. Analog zur AUC kann die AUMC demnach durch folgende Formel ausgedrückt werden:

$$AUMC = \int_0^{\infty} Ct \cdot dt$$

Die AUMC kann ebenfalls per Trapezregel abgeschätzt werden. Zusammen mit der AUC lässt sich aus ihr die mittlere Verweildauer (s. 1.3.3) der untersuchten Substanz berechnen.

### 1.3.3 Mittlere Verweildauer (mean residence time, MRT)

Die mittlere Verweilzeit einer Substanz stellt den Mittelwert der Aufenthaltszeiten jedes einzelnen Moleküls dar. In sie fließen alle kinetischen Prozesse von der Freisetzung aus einer nicht intravenös verabreichten Arzneiform bis hin zur Elimination ein. Das bedeutet, dass für einen Wirkstoff, der in verschiedenen Arzneiformen appliziert wird, jeweils eine andere MRT resultiert (Langguth 2004). Sie kann als Quotient der Fläche unter der ersten Momentkurve und der AUC berechnet werden:

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC}$$

### 1.3.4 Clearance (CL)

Als Clearance wird das Blut- bzw. Plasmavolumen bezeichnet, das pro Zeiteinheit von einer Substanz vollständig befreit wird. Die totale Clearance ( $CL_{tot}$ ) kann als Quotient aus der verabreichten Dosis und der AUC berechnet werden.

$$CL_{tot} = \frac{D}{AUC}$$

Sie ist als Summe der Clearances der einzelnen, eliminierenden Organe zu verstehen. Dabei leisten die renale Clearance ( $CL_R$ ) und die hepatische Clearance ( $CL_H$ ) den größten Beitrag. Oft wird jedoch nur zwischen renaler und extrarenaler Clearance unterschieden (Langguth 2004). Die renale Clearance kann bestimmt werden, indem sämtlicher, nach der Verabreichung der untersuchten Substanz, ausgeschiedener Urin für möglichst lange Zeit gesammelt wird. Die in den Urinen gemessenen Einzelmengen werden zur ausgeschiedenen Menge (amount excreted,  $A_e$ ) summiert und ergeben bei Division durch die AUC die renale Clearance.

$$CL_R = \frac{A_e}{AUC} = \frac{A_e \cdot CL_{tot}}{D}$$

Aus der Differenz von  $CL_{tot}$  und  $CL_R$  erhält man die extrarenale Clearance, mit der sich gemäß obiger Definition der hepatische Anteil an der Elimination abschätzen lässt (Langguth 2004).

### 1.3.5 Eliminationshalbwertszeit ( $t_{1/2}$ )

Die Eliminationshalbwertszeit ist die Zeit, in der die im Plasma vorliegende Konzentration eines Arzneistoffes um 50% sinkt. Meist lassen sich Konzentrations-Zeit-Kurven in mehrere Abschnitte einteilen, die jeweils unterschiedliche Eliminationshalbwertszeiten aufweisen. Zu Beginn lassen neben der einsetzenden Elimination, auch Verteilungsprozesse in andere Gewebe, die Konzentration stärker absinken. Neben dieser initialen Halbwertszeit ( $t_{1/2}(\alpha)$ ), lässt sich auch eine terminale Halbwertszeit ( $t_{1/2}(\beta)$ ) bestimmen, wenn im weiteren Verlauf die Verteilung größtenteils abgeschlossen ist und Eliminationsprozesse überwiegen. Der Verlauf der Konzentrations-Zeit-Kurve wird in dieser terminalen Phase im Wesentlichen durch zwei Eliminationskinetiken beeinflusst (Aktories et al. 2009). Nimmt die Eliminationsgeschwindigkeit mit sinkender Plasmakonzentration ab, folgt die Elimination einer sogenannten Kinetik erster Ordnung. Bleibt die Geschwindigkeit trotz sinkender Konzentration konstant, verläuft die Elimination, unabhängig von der Plasmakonzentration, nach einer Kinetik nullter Ordnung. Dies ist meist dann der Fall, wenn ein oder mehrere, an der Elimination beteiligte, Schlüsselenzyme gesättigt sind. Die Elimination eines

Arzneistoffes nach einer Kinetik erster Ordnung kann demnach durch die Gabe einer entsprechend hohen Dosis in die Elimination nach nullter Ordnung übergehen.

Anhand der Eliminationshalbwertszeit lässt sich abschätzen, wie viel Zeit benötigt wird, bis sich bei regelmäßiger Arzneimiteleinnahe ein Fließgleichgewicht zwischen resorbierter und eliminierten Wirkstoffmenge eingestellt hat. Dieses sog. steady state (SS) lässt sich meist nach fünf Eliminationshalbwertszeiten erreichen. Wird die Applikation des Arzneistoffes beendet, dauert es in etwa ebenfalls fünf Eliminationshalbwertszeiten, bis der Arzneistoff als nahezu vollständig eliminiert angesehen werden kann (Aktories et al. 2009).

### 1.3.6 Verteilungsvolumen (Volume of Distribution, $V_D$ )

Das Verteilungsvolumen, auch scheinbares Verteilungsvolumen genannt, ist eine fiktive Größe, die angibt in welchem Volumen sich eine Substanz verteilen müsste, um die im Blut gemessene Konzentration zu erreichen. Für eine intravenös verabreichte Dosis  $D$ , die im Blut in einer Anfangskonzentration  $c_0$  resultiert, gilt daher :

$$V_D = \frac{D}{c_0}$$

Im Wesentlichen ist das Verteilungsvolumen von den Eigenschaften der verabreichten Substanz abhängig. Ist sie sehr hydrophil oder bindet sehr stark an Plasmaproteine, entspricht das Verteilungsvolumen in etwa dem Blutvolumen. Lipophile Substanzen dagegen können sich z.B. im Fettgewebe anreichern, was dazu führt, dass das scheinbare Verteilungsvolumen sehr viel größer als das Blutvolumen ist.

Häufig wird jedoch das Verteilungsvolumen im steady state ( $V_{ss}$ ) angegeben, das unabhängig von Verteilungs- und Eliminationsprozessen für einen intravenös verabreichten Wirkstoff berechnet und für Vergleiche herangezogen werden kann (Heinzel et al. 1993). Es kann aus der mittleren Verweildauer und der Clearance berechnet werden, ist aber faktisch die Summe der Verteilungsvolumina der einzelnen Kompartimente:

$$V_{ss} = CL \cdot MRT$$

### 1.3.7 Bioverfügbarkeit (Bioavailability, $F$ )

Die Bioverfügbarkeit ist ein Maß für die Geschwindigkeit und das Ausmaß, mit dem ein Arzneistoff in unveränderter Form am Wirkort zur Verfügung steht. Ist eine Konzentrationsbestimmung am Wirkort nicht möglich, wird die Konzentration stattdessen im systemischen Blutkreislauf gemessen. Daher ist ein intravenös (i.v.) applizierter Arzneistoff definitionsgemäß zu 100% bioverfügbar. Bei anderen Applikationsarten, also z.B. der oralen Verabreichung (p.o.), wird die Bioverfügbarkeit durch mehrere Faktoren beeinflusst. Diese

sind unter anderem die Freisetzung des Wirkstoffes aus der Arzneiform, Wechselwirkung mit anderen oral aufgenommenen Substanzen, die Resorption im Darm und der Metabolismus bzw. die Ausscheidung des Wirkstoffes, bevor dieser den Wirkort erreichen kann. Vor allem der bei der ersten Leberpassage auftretende First-Pass-Effekt spielt hier eine wichtige Rolle. Zur Berechnung der absoluten Bioverfügbarkeit wird der Quotient aus der, durch Verabreichung der untersuchten Arzneiform, erhaltenen AUC (s. Kap 1.3.1) und der AUC der intravenösen Gabe gebildet:

$$F_{abs} = \frac{AUC_{p.o.}}{AUC_{i.v.}}$$

Bei der Bezugnahme auf einen ebenfalls nicht intravenös verabreichten Standard (S), spricht man von relativer Bioverfügbarkeit:

$$F_{rel} = \frac{AUC_{p.o.}}{AUC_S}$$

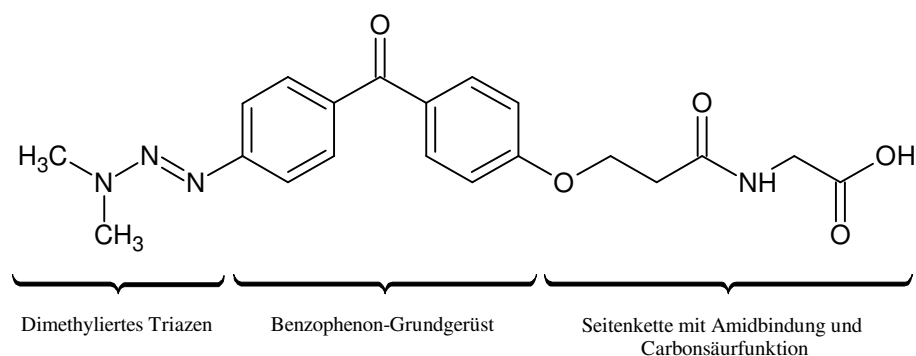
## 1.4 TriN2755 als neues Triazen

### 1.4.1 Struktur

Vergleichbar zu den bereits erwähnten Wirkstoffen Dacarbazin und Temozolomid (s. Kap. 1.1.2 und 1.1.3) handelt sich bei TriN2755 um eine Verbindung, die eine Triazengruppe trägt, welche für die zytotoxische Wirkung verantwortlich gemacht wird. Wie durch den Namen bereits angedeutet, besteht sie aus drei aneinander geknüpften Stickstoffatomen und ist wie auch beim Dacarbazin dimethyliert. Die Aktivierung analog zum Dacarbazin scheint wahrscheinlich, da im Rahmen der präklinischen Voruntersuchung bei der Inkubation von TriN2755 mit humanen Hepatozyten entsprechende Metaboliten gefunden wurden, auf die im Folgenden weiter eingegangen wird.

Die Triazengruppe ist in para-Stellung an einen Ring eines Diphenylmethanon-Grundgerüsts gebunden, welches auch als Benzophenon bezeichnet wird und aus zwei Benzolringen besteht, welche über eine Carbonylgruppe miteinander verbunden sind. Am zweiten Ring des Benzophenons befindet sich ebenfalls in para-Stellung, eine mittels Etherbrücke gebundene Seitenkette. Faktisch handelt es sich dabei um, mit Glycin kondensierte, 3-Hydroxypropansäure. Die Strukturformel von TriN2755 ist in Abbildung 2 zusammen mit den wesentlichen Strukturmerkmalen dargestellt.





**Abb. 2 Strukturmerkmale von TriN2755**

#### 1.4.2 Präklinik

Vor der Anwendung von TriN2755 am Menschen wurden in zahlreichen Tierversuchen Wirksamkeit und Unbedenklichkeit untersucht. Für die Zulassung zur Phase-I-Studie mussten der zuständigen Arzneimittelbehörde die Ergebnisse der präklinischen Prüfung vorgelegt werden. Daher waren zu Beginn dieser Arbeit sämtliche Versuche bereits abgeschlossen. Die Durchführung dieser Versuche ist, wie die Studiendurchführung selbst, stark reglementiert und wird zu einem großen Teil durch die Leitlinien der US-amerikanischen Behörde für Lebensmittel- und Arzneimittelsicherheit (FDA) (U.S. Food and Drug Administration 2012), der Europäischen Arzneimittelagentur (European Medicines Agency 2012) und der Internationalen Konferenz zur Harmonisierung der Prüfanforderungen im Arzneimittelbereich (ICH) (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use 2012) geregelt. So wird beispielsweise auch vorgeschrieben, dass die Prüfung nicht nur an Nagern, sondern auch an Nichtnagern durchgeführt werden muss. Daher wurden neben Mäusen und Ratten vor allem Hunde (Beagle) für einen Vergleich der Pharmakokinetik bei oraler und intravenöser Gabe sowie für toxikokinetische bzw. toxikologische Untersuchungen verwendet. Zur Untersuchung der Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Art der Verabreichung erhielten weibliche Beagle entweder eine Kurzinfusion oder eine orale Dosis TriN2755. Vor der Gabe und bis zu 24 Stunden nach der Applikation wurden Blutproben entnommen und die TriN2755-Spiegel bestimmt. Es wurde eine sehr schnelle Elimination mit Halbwertszeiten von 20 – 40 Minuten, in Abhängigkeit von Dosis und Applikationsform, festgestellt. Aus den Ergebnissen konnte zudem die orale Bioverfügbarkeit von TriN2755 (s. Kap. 1.3.7) bestimmt werden, die bei den getesteten Hündinnen unter 10% lag. Im Rahmen der Toxikokinetikstudie wurden Beagle beider Geschlechter zwei Mal pro Woche eine von vier verschiedenen TriN2755 Dosen (0, 25, 50, 100mg/kg Körpergewicht) infundiert. Eine Betrachtung der Plasmaspiegel über 24 Stunden wurde nach der ersten und fünften Gabe durchgeführt. Dabei wurden innerhalb der Dosisgruppen weder Unterschiede beim Vergleich der Plasmaspiegel

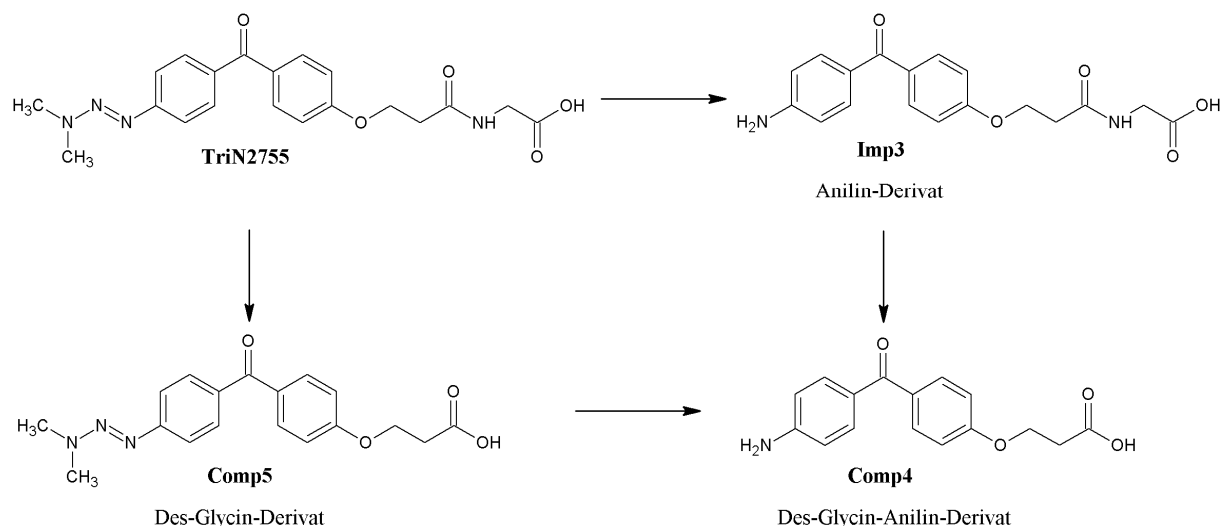
nach den beiden Gaben noch Unterschiede zwischen den Geschlechtern festgestellt. In der Hochdosisgruppe zeigte sich eine biphasische Elimination, also ein steiler Anfangsverlauf und ein späteres Abflachen der Konzentrations-Zeit-Kurven, sowie ein hohes scheinbares Verteilungsvolumen (s. Kap. 1.3.6), das für eine Verteilung in ein tiefes Kompartiment spricht. Dennoch konnte keine Akkumulation von TriN2755 festgestellt werden. Durch überproportional ansteigende Plasmaspiegel im Vergleich zu den anderen Dosisgruppen deutete sich in der Hochdosisgruppe zusätzlich ein Wechsel von linearer hin zu nichtlinearer Pharmakokinetik an. Zur Beurteilung der Toxizität wurde die Behandlung in allen Gruppen insgesamt 28 Tage lang durchgeführt. In der mittleren und Hochdosisgruppe kam es bei allen Hunden nach und während der Therapie zu Erbrechen. In der Hochdosisgruppe kam es zusätzlich zu Durchfällen. In beiden Fällen waren weibliche Hunde öfter betroffen. Ein männliches Tier der mittleren Dosisstufe musste nach sechs Gaben aufgrund eines Katheterverschlusses eingeschläfert werden. Ein weibliches Tier der Hochdosisgruppe, bei dem eine starke Knochenmarkdepression festgestellt wurde, verstarb an Tag 12. Die anderen Tiere in der Hochdosisgruppe wiesen ebenfalls Veränderungen am Knochenmark und im Blutbild auf. Nach einer anschließenden 28-tägigen Erholungsphase waren diese jedoch nicht mehr feststellbar. Aufgrund der gefundenen und beobachteten Nebenwirkungen wurde eine zweitägliche Verabreichung von 100mg/kg im Hund als toxische Dosis und 50mg/kg als Maximal Tolerierte Dosis (MTD) definiert. Da bei 25mg/kg keine Nebenwirkungen festgestellt wurden, wurde diese Dosis als sog. NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) deklariert.

Mit Ratten wurden analoge Versuche durchgeführt und ebenfalls die drei oben genannten Dosislevel bestimmt. Die NOAEL-Dosen dienten als Anhaltspunkte bei der Wahl der Startdosis für die Anwendung beim Menschen. Unter Berücksichtigung eines entsprechend großen Sicherheitsspielraumes wurde die Startdosis auf 25mg pro Patient, unabhängig vom Körpergewicht, festgelegt. Anhand des Auftretens der Nebenwirkungen wurde für Behandlungsarm A die Behandlung einmal alle 28 Tage geplant. Für die dosisintensivierte Gabe bei gleichbleibender monatlicher Gesamtdosis sollten Patienten in Behandlungsarm B einmal pro Woche behandelt werden.

#### 1.4.3 Metabolismus von TriN2755

Erste Versuche zur Aufklärung des metabolischen Profils wurden mit Hilfe von hepatischen Mikrosomen durchgeführt. Dazu wurden Mikrosomen von Ratten und Hunden sowie menschliche Mikrosomen mit TriN2755 inkubiert und nach zwei Stunden mittels MS-gekoppelter Chromatografie (LC/MS) auf entstandene Metaboliten überprüft. Dabei wurden

in allen Ansätzen drei Verbindungen identifiziert, deren Menge speziesabhängig variierte. Die Hydrolyse der Amidbindung in der Seitenkette führte zu einem, als Comp5 bezeichnetem Des-Glycin-Derivat. Die oxidative Umwandlung der Triazengruppe von TriN2755 und Comp5 lieferte die entsprechenden Anilin-Derivate, die als Imp3 bzw. Comp4 (s. Abb. 3) bezeichnet wurden.



**Abb. 3 Metabolisierung von TriN2755 nach Inkubation mit Mikrosomen**

Die Bezeichnungen der Metaboliten wurden im Rahmen der Synthese von TriN2755 vergeben, in der anfangs mehrere Verbindungen als Verunreinigungen oder Nebenprodukte auffielen. Aus diesem Grund waren weitere, auf dem Benzophenongerüst basierende Derivate von TriN2755 bereits bekannt, deren Rolle im Metabolismus noch ungeklärt war. Dennoch wurde dem Pharmakokinetik-Labor bereits vor Beginn der Studie ein Flussdiagramm (s. Abb. 4) zur Verfügung gestellt, in dem bereits einzelne Zusammenhänge der bekannten Metabolite angedeutet wurden. Zudem wurde prognostiziert welchen Anteil jeder Metabolit an der Gesamtheit der aus TriN2755 gebildeten Metaboliten einnehmen würde. Zu diesem Zeitpunkt war TriN2755 noch nicht im Humanversuch angewendet worden. Die angegebenen Prozentzahlen resultierten daher aus theoretischen Überlegungen heraus, die auf den Ergebnissen der präklinischen Untersuchungen beruhten.

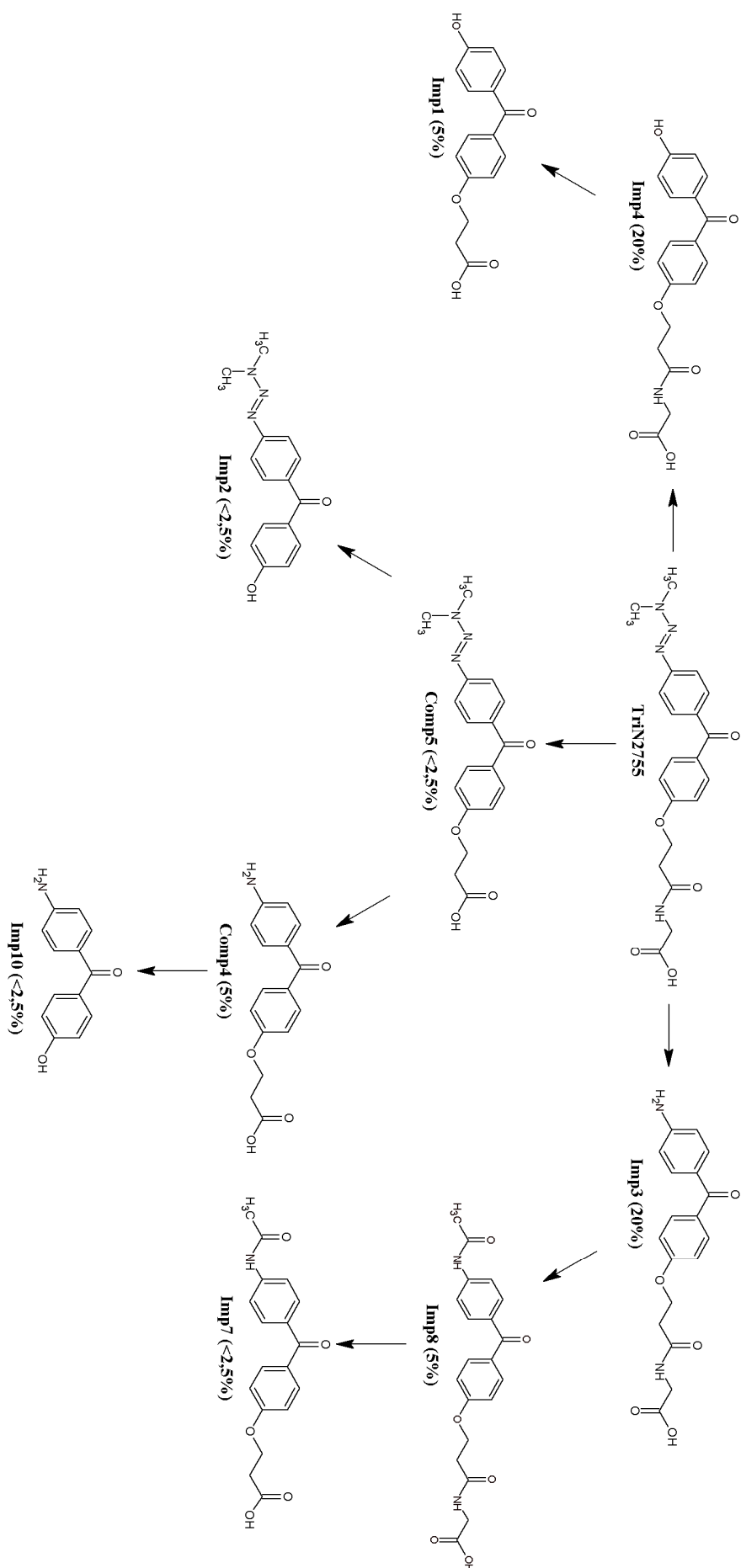


Abb. 4 Erwarteter Metabolismus von TriN2755 vor Beginn der Phase-I-Studie. Der prognostizierte Anteil der einzelnen Metaboliten ist in Klammern angegeben

## 1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das pharmakologische Verhalten von TriN2755 nach Anwendung am Menschen mit Hilfe eines validierten Messsystems zu untersuchen und die aus der Präklinik vorliegenden Daten zu verifizieren.

Hierzu sollten die Konzentrationen von TriN2755 und seiner Metaboliten in Plasma- und Urinproben bestimmt werden, die im Rahmen einer First-in-man Studie gewonnen wurden.

Geplant war diese Konzentrationen mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) gekoppelter photometrischer und massenspektrometrischer Detektion zu messen. Um der laut den GCP-Richtlinien (Good Clinical Practice) geforderten, validierten analytischen Methode gerecht zu werden, wurde die Konzentrationsbestimmung aus menschlichem Plasma mitsamt der vorausgehenden Aufarbeitung validiert. Dafür wurden alle Parameter anhand der Vorgaben der Internationalen Konferenz zur Harmonisierung der Prüfanforderungen im Arzneimittelbereich untersucht.

Im Folgenden wurden Blut- und Urinproben der teilnehmenden Patienten nach obigen Verfahren aufgearbeitet und gemessen. Die erhaltenen Daten wurden, neben der quantitativen Auswertung der bereits bekannten Verbindungen, auch auf noch unbekannte Metaboliten überprüft.

Unter Berücksichtigung der gewonnen Erkenntnisse zum Stoffwechsel von TriN2755 sollte dann ein pharmakokinetisches Kompartimentmodell erstellt werden. Mit Hilfe spezieller Software war es mit den erhobenen Daten anschließend möglich, die zu dem Modell gehörenden pharmakokinetischen Parameter zu berechnen.

Zusätzlich sollten in vitro Untersuchungen zum Metabolismus und zur Wirkung von TriN2755 an humanen peripheren Blutzellen durchgeführt werden. Dazu wurden Leukozyten aus dem Blut eines gesunden Spenders verwendet. Nach der Inkubation der Zellen mit TriN2755 sollte der Ansatz einerseits auf entstandene Metaboliten von TriN2755 und andererseits auf die postulierte DNA-methylierende Fähigkeit hin untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Referenzsubstanzen

Alle nachfolgend aufgeführten Referenzsubstanzen wurden von Syngene International Ltd., Bangalore, Indien zur Verfügung gestellt.

Bei der Substanz TriN2758 handelt es sich um einen weiteren Entwicklungskandidaten, dessen Konzentration in biologischen Matrices aufgrund ähnlicher Strukturmerkmale ebenfalls mit der vorgestellten validierten Analytik bestimmt werden kann. Aus Gründen der Geheimhaltung können jedoch keine weiteren Angaben zum Aufbau und den Eigenschaften des Moleküls gemacht werden.

#### Comp4

Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>
Molare Masse [g/mol]	285,29

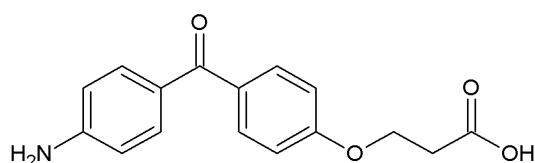


Abb. 5 Strukturformel von Comp4

#### Comp5

Summenformel	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
Molare Masse [g/mol]	341,36

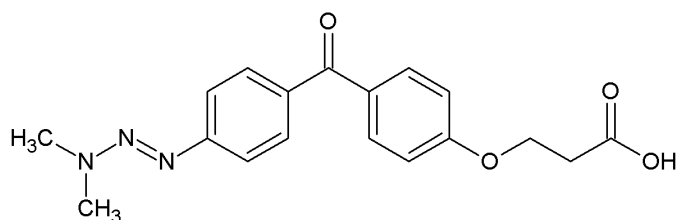


Abb. 6 Strukturformel von Comp5

Comp6

Summenformel	$C_{21}H_{24}N_4O_5$
Molare Masse [g/mol]	412,44

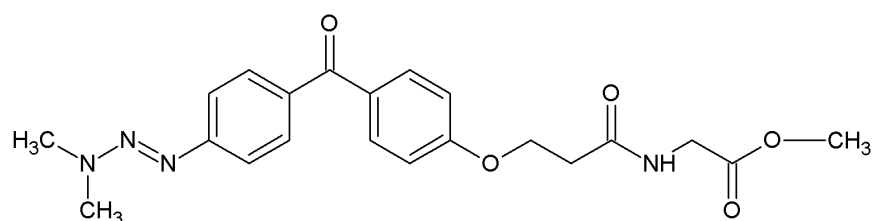


Abb. 7 Strukturformel von Comp6

Imp1

Summenformel	$C_{16}H_{14}O_5$
Molare Masse [g/mol]	286,28

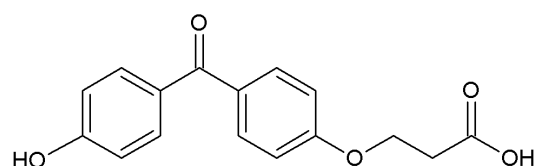


Abb. 8 Strukturformel von Imp1

Imp2

Summenformel	$C_{15}H_{15}N_3O_2$
Molare Masse [g/mol]	269,30

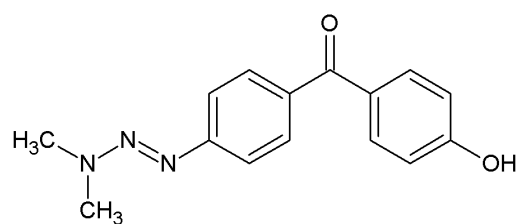


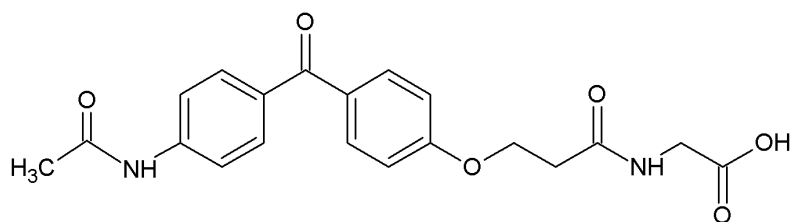
Abb. 9 Strukturformel von Imp2





### Imp8

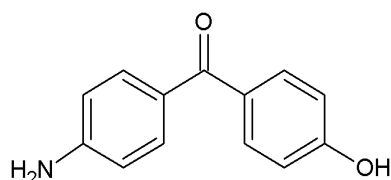
Summenformel	$C_{20}H_{20}N_2O_6$
Molare Masse [g/mol]	384,38



**Abb. 13 Strukturformel von Imp8**

### Imp10

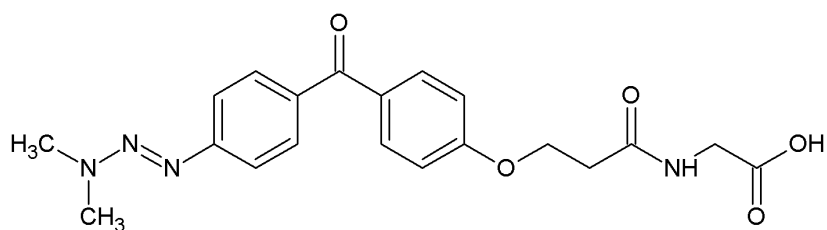
Summenformel	$C_{13}H_{11}NO_2$
Molare Masse [g/mol]	213,23



**Abb. 14 Strukturformel von Imp10**

### TriN2755

Summenformel	$C_{20}H_{22}N_4O_5$
Molare Masse [g/mol]	398,41



**Abb. 15 Strukturformel von TriN2755**

### 2.1.2 Chemikalien

3-Methyladenin

Sigma-Aldrich, Steinheim

6-O-Methylguanin 97,0%

Sigma-Aldrich, Steinheim

7-Methylguanin  $\geq 98,0\%$  (HPLC)

Sigma-Aldrich, Steinheim

9-Methylguanin  $\geq 98,0\%$  (HPLC)

Sigma-Aldrich, Steinheim

Acetonitril (ACN) CHROMASOLV <sup>®</sup> gradient grade, for HPLC	Sigma-Aldrich, Steinheim
Adenin $\geq 99,0\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ameisensäure 98 - 100% p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat purum p.a.	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	J.T. Baker., Deventer, Niederlande
GIBCO <sup>®</sup> Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Guanin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Heptafluorbuttersäure (HFBA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat puriss. p.a.	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol (MeOH) CHROMASOLV <sup>®</sup> , for HPLC	Sigma-Aldrich, Steinheim
N <sup>6</sup> -Methyladenin $\geq 99,0\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-N-Lauroylsarkosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natronlauge 2M	Merck KGaA, Darmstadt
Phenol equilibriert, n-stabilisiert : Chloroform :	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isoamylalkohol 25:24:1	
Polymorphprep <sup>™</sup>	AXIS-SHIELD Poc AS, Oslo, Norwegen
Proteinase K	AppliChem GmbH, Darmstadt
RNAse A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Salzsäure 5M	Merck KGaA, Darmstadt
Titriplex <sup>®</sup> III Dinatriummethylenitrilo-tetraessigsäure-Dihydrat p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Wasser, bidestilliert	

### 2.1.3 Hergestellte Lösungen

Ameisensäure 0,1%:

2,5l bidestilliertes Wasser wurden mit 2,5ml Ameisensäure (98 - 100%) versetzt. Nach dem Mischen wurde die Lösung mittels BottleTop-Filter filtriert und im Ultraschallbad entgast.

Ethanol 70%:

70ml Ethanol wurden mit 30ml bidestilliertem Wasser gemischt.

Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)-Lösung 0,5M, pH 8:

18,61g Titriplex<sup>®</sup> III wurden in 80ml bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit NaOH 2M eingestellt und mit Wasser auf 100ml aufgefüllt.

Heptafluorbuttersäure 1%:

1l bidestilliertes Wasser wurde mit 1ml HFBA versetzt. Nach dem Mischen wurde die Lösung mittels BottleTop-Filter filtriert.

Heptafluorbuttersäure 0,1%:

13,5ml bidestilliertes Wasser wurden mit 1,5ml HFBA 1% gemischt.

Lysepuffer:

Der Lysepuffer ist ein Gemisch aus mehreren hergestellten Lösungen. Folgende Lösungen wurden in ein 15ml-Probenröhrchen pipettiert und bei 4°C gelagert: 6250µl Sarkosin-Lösung 1%, 5062,5µl bidestilliertes Wasser, 625µl TRIS-Puffer 1M, pH 8, 312,5µl Proteinase K-Lösung 20mg/ml und 250µl EDTA-Lösung 0,5M, pH 8

Methanol 5%:

475ml bidestilliertes Wasser wurden mit 25ml Methanol gemischt.

Methanol 20%:

40ml bidestilliertes Wasser wurden mit 10ml Methanol gemischt.

Methanol 50%:

1l bidestilliertes Wasser wurde mit 1l Methanol gemischt.

Phosphatpuffer-Salzgemisch

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat und Kaliumdihydrogenphosphat wurden im Verhältnis 6:1 miteinander vermischt.

Proteinase K-Lösung 20mg/ml:

20mg Proteinase K wurden in 1ml bidestilliertem Wasser gelöst.

RNAse A-Lösung 20mg/ml:

20mg RNAse A wurden in 1ml bidestilliertem Wasser gelöst.

Sarkosin-Lösung 1%:

120mg Natrium-N-Laurylsarkosin wurden in 12ml bidestilliertem Wasser gelöst.

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)-Puffer 1M, pH 8:

12,11g TRIS wurden in 80ml bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit HCl 5M eingestellt und mit Wasser auf 100ml aufgefüllt.

#### 2.1.4 Geräte

Analysenwaage	Mettler H21, Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Eismaschine	AF 80, Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Fluoreszenzdetektor	Waters W474 Fluoresence Detector, Waters GmbH, Eschborn
HPLC	Waters 2695 Separations Module, Waters GmbH, Eschborn
HPLC-Säule (Studienproben)	EC 250/4 NUCLEODUR® C <sub>18</sub> ISIS, 5µm (250 x 4mm) mit Vorsäule CC 8/4 NUCLEODUR® C <sub>18</sub> ISIS, 5µm (8 x 4mm), Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren
HPLC-Säule (DNA-Addukte)	Symmetry C <sub>18</sub> , 5µm (250 x 4,6mm) mit Vorsäule Symmetry C <sub>18</sub> , 5µm (20 x 3,9mm), Waters GmbH, Eschborn
Laborwaage	KernEW 1500-2M, Kern & Sohn GmbH, Balingen
Massenspektrometer	Waters Micromass ZQ 2000, Waters GmbH, Eschborn
PDA-Detektor	Waters 996 PDA Detector, Waters GmbH, Eschborn
pH-Meter	pH 530, Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim
Pipetten	Eppendorf Reference®, Eppendorf AG, Hamburg Eppendorf Research®, Eppendorf AG, Hamburg
Rotationsofen	Mini-Hybridisierungsofen OV2, Biometra GmbH, Göttingen
Thermoblock	Thermostat 5320, Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallbad	Branson B-32, Branson Ultrasonics Corp., Danburg, USA
Vakuumkammer	CHROMABOND® Vakuumkammer mit Kunststoff-Durchflusshähnen und Edelstahlnadeln, Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren
Vakuumkonzentrator	Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg
Vortex-Schüttler	Vortex-Genie Modell K550-GE, Bender und Holbein AG, Zürich, Schweiz

Wasseraufbereitung	Köttermann 1034, Köttermann Labortechnik GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen
Zellzähler	Coulter Ac T8 Hematology Analyzer, Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifugen	Rotanta 96, Hettich Zentrifugen, Mülheim a.d. Ruhr Rotanta 96 R, Hettich Zentrifugen, Mülheim a. d. Ruhr EBA 12R, Hettich Zentrifugen, Mülheim a. d. Ruhr
UV/Vis-Spektrometer	UV-2450, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, USA

#### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Cellstar <sup>®</sup> Probengefäß, konisch (15 und 50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Centrifree <sup>®</sup> YM-30	Merck Millipore Ltd., Carrigtwohill, Irland
Ultrafiltrationseinheit	
Cryo.s <sup>™</sup> Cryovials (2 und 5ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
EDTA-Monovette 7,5 und 9ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Eppendorf Safe-Lock Tubes (1,5ml und 2ml)	Eppendorf AG, Hamburg
epT.I.P.S. <sup>®</sup> Pipettenspitzen (20µl – 10ml)	Eppendorf AG, Hamburg
HPLC-Dichtscheibe G8, -PTFE, -Sil/gs	CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe
HPLC-Mikroeinsatz G30	CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe
HPLC-Probenflasche G1, braun	CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe
HPLC-Schraubkappe G8	CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe
Nalgene <sup>®</sup> Bottle Top Filter 150ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Oasis <sup>®</sup> HLB 3cc (60mg) SPE-Säulen	Waters Corporation, Milford, USA
Pasteur-Pipetten 3ml, graduert	Ratiolab GmbH, Dreieich
Polyethylen-Lamellenstopfen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Polypropylen-Röhrchen 5ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Phase Lock Gel Light Tubes 2ml	5 Prime GmbH, Hamburg
PLASTIBRAND <sup>®</sup> micro-UV-Küvetten	Brand GmbH + CO KG, Wertheim
Amicon Ultra-0,5 Ultrafiltrationseinheit mit Ultracel-10 Membran	Merck Millipore Ltd., Carrigtwohill, Irland

## 2.2 Dosiseskaltionsstudie

### 2.2.1 Studiendesign

Bei der durchgeführten Phase-I-Studie handelte es sich ursprünglich um eine offene Zwei-Zentren-Studie im Parallelgruppendesign. Im Universitätsklinikum Essen wurden 42 Patienten (s. Tab. 2.1) in die Studie aufgenommen, von denen 37 mit TriN2755 behandelt wurden. Im zweiten Prüfzentrum in Freiburg erhielt ein Patient die Studienmedikation. Aufgrund einer konkurrierenden Studie mit ähnlicher Indikation wurde Freiburg im Laufe der Studie als Prüfzentrum wieder abgemeldet, so dass es sich ab diesem Zeitpunkt um eine monozentrische Studie handelte. Insgesamt wurden 16 weibliche und 22 männliche Studienpatienten therapiert.

Die Studie gliederte sich in zwei Arme (A und B), denen die Patienten zugeteilt wurden. In Arm A wurden 21 Patienten alle 28 Tage in einem 4-wöchentlichen Zyklus TriN2755 infundiert. Die 17 Patienten in Arm B erhielten alle 7 Tage eine Infusion der Studienmedikation. Die Zuordnung der Patienten aus Essen in die unterschiedlichen Dosisstufen der beiden Behandlungsarme wurde zusammen mit den Behandlungszeiträumen in Abbildung 76 im Anhang grafisch dargestellt.

Von Seiten des Sponsors war vorgesehen etwa 42 Patienten in diesen Teil der Studie einzuschließen. Im Falle des Erreichens des primären Endpunktes sollten in einem zweiten Teil weitere 18 Patienten eingeschlossen werden. Die Fallzahlplanung wurde vom Sponsor pragmatisch festgelegt und basierte nicht auf statistischen Überlegungen.

**Tab. 2.1 Demographische Daten der in die Studie aufgenommenen Patienten**

Patient-Nr.	Alter [Jahre]	Größe [m]	Gewicht [kg]	Oberfläche <sup>a</sup> [m <sup>2</sup> ]	Geschlecht	Arm	Dosis [mg]
01-01	49	1,70	73,0	1,84	m	A	25
01-02	70	1,69	58,0	1,66	w	A	50
02-01	53	1,64	64,0	1,70	w	A	100
01-03	55	1,65	55,7	1,61	w	A	200
01-04	47	1,62	98,0	2,02	w	A	400
01-05	26	1,86	73,0	1,97	m	A	800
01-06	-	-	-	-	-	-	-
01-07	54	1,81	91,0	2,12	w	A	1.600
01-08	78	1,84	75,0	1,97	m	A	3.200
01-09	63	1,65	52,1	1,56	w	A	3.200
01-10	40	1,78	65,0	1,81	m	A	3.200
01-11	43	1,65	93,6	2,00	w	A	2.400 <sup>b</sup>
01-12	65	1,73	93,0	2,07	w	A	4.000
01-13	72	1,70	85,0	1,97	m	A	4.000
01-14	57	1,53	68,3	1,66	w	A	4.000
01-15	58	1,87	87,5	2,13	m	A	5.000

01-16	29	1,68	63,0	1,72	w	B	800
01-17	-	-	-	-	-	-	-
01-18	48	1,68	99,5	2,08	w	B	800
01-19	74	1,92	100,0	2,30	m	A	5.000
01-20	67	1,80	86,0	2,06	m	A	5.000
01-21	43	1,83	83,0	2,05	m	B	800
01-22	58	1,78	77,5	1,95	m	B	1.200
01-23	-	-	-	-	-	-	-
01-24	-	-	-	-	-	-	-
01-25	59	1,68	72,0	1,82	w	B	1.200
01-26	50	1,80	86,0	2,06	m	B	1.200
01-27	-	-	-	-	-	-	-
01-28	56	1,88	113,0	2,39	m	B	1.200
01-29	38	1,77	94,0	2,11	m	A	6.000
01-30	68	1,73	80,0	1,94	m	A	6.000
01-31	74	1,68	75,5	1,85	w	A	6.000
01-32	71	1,80	86,0	2,06	m	B	1.700
01-33	64	1,81	93,0	2,14	m	B	1.700
01-34	64	1,68	60,0	1,68	w	B	1.700
01-35	61	1,76	82,0	1,98	m	A	6.000
01-36	55	1,77	88,0	2,05	m	B	2.400
01-37	53	1,96	82,0	2,15	m	B	2.400
01-38	49	1,52	48,5	1,43	w	B	2.400
01-39	70	1,59	67,5	1,70	w	B	2.400
01-40	56	1,71	66,0	1,77	m	B	3.000
01-41	41	1,83	108,0	2,30	m	B	3.000
01-42	57	1,70	83,0	1,95	m	B	3.000
Mittelwert	56	1,74	79,6	1,94			
Standardabw.	15,1	0,1	15,4	0,2			
Grenzen	26 - 78	1,52 - 1,96	48,5 - 113	1,43 - 2,39			
Median	57	1,73	82,0	1,97			

<sup>a</sup> berechnet nach DuBois u. DuBois

<sup>b</sup> durch Paravasat reduziert auf 2400mg

Mindestens 4 Wochen nach der ersten Behandlung wurde unter Berücksichtigung der gewonnenen Daten und den Vorgaben des Studienprotokolls die Steigerung der Dosis durch ein Data Safety Monitoring Board (DSMB) für nachfolgende Patienten beraten.

Das Protokoll sah zu Beginn für beide Arme eine beschleunigte Eskalationsphase, mit jeweils einem Patient pro Dosisstufe, vor. Auftretende Nebenwirkungen wurden mit Hilfe der Common Toxicity Criteria (CTC, dt. Allgemeine Toxizitätskriterien) in Schweregrade eingeteilt. Traten keine oder nur Nebenwirkungen vom CTC Grad 1 auf, durfte die Dosis für den nachfolgenden Patienten um 100% gesteigert werden. Traten zum ersten Mal Nebenwirkungen  $\geq$  CTC Grad 2 auf, mussten 2 weitere Patienten auf derselben Dosisstufe therapiert werden. Wurde keine Nebenwirkungen  $\geq$  CTC Grad 2 bei diesen Patienten

beobachtet, konnte die beschleunigte Eskalation mit drei Patienten pro Dosisstufe fortgesetzt werden. Sie endete, falls bei mindestens einem der beiden zusätzlichen Patienten im ersten Zyklus ebenfalls Nebenwirkungen  $\geq$  CTC Grad 2 auftraten. In der sich anschließenden Standard-Eskalationsphase mussten ebenfalls 3 Patienten pro Dosisstufe therapiert werden. Die Dosissteigerung betrug jedoch nur noch 40%. Einige Nebenwirkungen wurden vom Studienprotokoll als Dosislimitierende Toxizität (DLT) definiert. Trat die DLT zum ersten Mal auf, mussten bis zu drei zusätzliche Patienten auf derselben Dosisstufe therapiert werden. Trat keine weitere DLT auf, wurde die Dosis für die nächsten Patienten um 40% gesteigert. Zeigte sich bei zwei oder mehr Patienten eine DLT, wurde die Dosisstufe als MTD definiert. In einer sich anschließenden Erweiterungsphase sollten pro Arm jeweils 9 Patienten eine Dosisstufe unter der MTD therapiert werden, um weitere Daten zur Sicherheit und Wirkung von TriN2755 zu sammeln. In den Tabellen 2.2 und 2.3 wurden die geplanten Dosissteigerung für Arm A und Arm B zusammengestellt. Abweichend davon konnte das DSMB die Dosis aus Sicherheitsgründen auch um einen geringeren Prozentsatz anheben.

**Tab. 2.2 Geplante Dosissteigerungen (in mg) in Arm A und Übergang von der beschleunigten Eskalationsphase (weiß) zur Standard-Eskalationsphase (grau) in Abhängigkeit vom Schweregrad auftretender Nebenwirkungen**

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Keine Toxizitäten $\geq$ CTC Grad 2		25	50	100	200	400	800	1600	3200						
Toxizität $\geq$ CTC Grad 2	Keine DLT bei 1600mg	25	50	100	200	400	800	1600	2400	3400					
	Keine DLT bei 800mg	25	50	100	200	400	800	1100	1500	2100	2600	3500			
	Keine DLT bei 400mg	25	50	100	200	400	560	780	1100	1500	2100	2600	3500		
	Keine DLT bei 200mg	25	50	100	200	280	400	560	780	1100	1500	2100	2600	3500	
	Keine DLT bei 100mg	25	50	100	140	200	280	400	560	780	1100	1500	2100	2600	3500

**Tab. 2.3 Geplante Dosissteigerungen (in mg) in Arm B und Übergang von der beschleunigten Eskalationsphase (weiß) zur Standard-Eskalationsphase (grau) in Abhängigkeit vom Schweregrad auftretender Nebenwirkungen**

		1	2	3	4
Keine Toxizitäten $\geq$ CTC Grad 2		400	800	1600	3200
Toxizität $\geq$ CTC Grad 2	Keine DLT bei 1600mg	400	800	1600	2400
	Keine DLT bei 800mg	400	800	1100	1500
	Keine DLT bei 400mg	400	560	780	1100

Alle Patienten wurden über den Ablauf der Studie aufgeklärt und mussten für die Teilnahme ihre schriftliche Einverständniserklärung abgeben. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen genehmigt und entsprach den Forderungen der Deklaration von Helsinki sowie geltenden nationalen und



internationalen Richtlinien. Zudem wurde die Studie in die Datenbank ClinicalTrials.gov der United States National Library of Medicine eingetragen. (U.S. National Library of Medicine 2013)

#### 2.2.2 Hauptzielgröße

Ziel der Studie war es die MTD von TriN2755 bei der Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren und Sarkomen zu finden.

#### 2.2.3 Nebenzielgröße

Anhand der gemessenen Plasmaspiegel sollte die Pharmakokinetik von TriN2755 bestimmt werden. Um diese zu beschreiben, wurden die maximale Plasmakonzentration ( $C_{\max}$ ), die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve, das Verteilungsvolumen des zentralen Kompartiments ( $V_c$ ) und das Verteilungsvolumen im steady state berechnet. Desweiteren wurden die terminale Halbwertszeit, die mittlere Verweildauer sowie die totale Clearance und die renale Clearance von TriN2755 ermittelt. Da die Messmethode für die Bestimmung der Spiegel im Urin nicht validiert wurde, wurden diese Werte zwar mit aufgenommen, hatten aber nur stützenden Charakter. Zusätzlich sollte im in vitro Versuch überprüft werden, ob die vermutete antitumorale Wirkung von TriN2755 auf Methylierung der DNA zurückzuführen ist. Neben der zu ermittelnden MTD war die DLT ebenfalls eine wichtige Kenngröße, die anhand auftretender Nebenwirkungen mit Hilfe der CTC abgeschätzt werden sollte. Dies geschah allerdings nicht im Rahmen dieser Arbeit.

#### 2.2.4 Ein-/Ausschlusskriterien

Ein Patient konnte nur in die Studie eingeschlossen werden, wenn er alle der folgenden Einschlusskriterien erfüllte:

- 18 Jahre oder älter
- Histologisch bestätigter, fortgeschrittener Tumor oder Sarkom, für den/das keine wirksame Therapie existierte
- Mindestens eine messbare Läsion nach RECIST 1.0 Kriterien oder eine nicht-messbare Läsion, bei der das Ansprechen bewertet werden konnte
- ECOG Performance Status 0, 1 oder 2
- Lebenserwartung von mindestens 3 Monaten
- Fähigkeit den Ablauf der Studie zu verstehen und die Bereitschaft die Einverständnisverklärung zu unterschreiben
- Die Bereitschaft den Vorgaben des Studienprotokolls für die Dauer der Studie nachzukommen

Ein Patient war für die Studie nicht geeignet, wenn eines der folgenden Ausschlusskriterien zutraf:

- Jede Art von Lymphom oder andere hämatologische Tumore
- Bekannte Hirnmetastasen
- Vorherige Tumorerkrankung, Ausnahmen: Nichtmelanomatöser Hautkrebs und Zervixkarzinome, die kurativ entfernt wurden
- Größere Operationen innerhalb von vier Wochen vor dem Start der Therapie
- Fokussierte oder großflächige Bestrahlung oder zytotoxische Chemotherapie innerhalb zwei Wochen vor Start der Therapie
- Anhaltende Nebenwirkungen einer vorherigen Chemotherapie (mit etablierten oder experimentellen Wirkstoffen)
- Einer der folgenden hämatologischen Parameter lag bei der Bestimmung der Basislinie außerhalb der Grenzen:
  - $Hb < 10 \text{ g/dl}$
  - Leukozyten  $< 3,0 \times 10^9 /l$
  - Neutrophile Granulozyten  $< 1,5 \times 10^9 /l$
  - Thrombozyten  $< 100 \times 10^9 /l$
- Einer der folgenden Leberwerte lag bei der Bestimmung der Basislinie außerhalb der Grenzen:
  - Serum-Bilirubin größer als das 1,5-fache des oberen Grenzwertes, oder größer als das 3-fache, bei hepatischer Metastasierung
  - ALT und AST größer als das 2,5-fache des oberen Grenzwertes, oder größer als das 5-fache, bei hepatischer Metastasierung
- Einer der folgenden Nierenfunktionstests lieferte bei der Bestimmung der Basislinie ein Ergebnis außerhalb der Grenzen:
  - Serum-Kreatinin  $> 1,5 \text{ mg/dl}$
  - Kreatinin-Clearance ( $Cl_{Krea}$ )  $< 50 \text{ ml/min}$ , berechnet nach der Cockcroft-Gault-Formel:  $Cl_{Krea} = \text{Gewicht [kg]} \times (140 - \text{Alter}) / (72 \times \text{Serum-Kreatinin Konzentration})$ ; für Männer:  $\times 1$ , für Frauen:  $\times 0,85$
- Jede klinisch relevante kardiovaskuläre Erkrankung, wie z.B. ein Myokardinfarkt innerhalb der letzten sechs Monate, medikamentenpflichtige Arrhythmie, unkontrollierter Bluthochdruck, gestörte Herzfunktion (NYHA-Klasse II oder höher), Herzfehler oder nicht kompensierte Herzerkrankungen (NYHA-Klasse II oder höher)
- Symptomatische Neurotoxizität (CTC Grad 2 oder höher)

- Zentralnervöse Symptome, die vom Primärtumor ausgingen und mit dem Inhalt der Studie oder der Einverständniserklärung nicht vereinbar waren
- Vorausgegangene psychische Erkrankungen, Krampfanfälle oder Störungen des zentralen Nervensystems, die vom Investigator als klinisch signifikant angesehen wurden und die Einwilligungsfähigkeit sowie adäquate Verlaufskontrollen einschränkten
- Größere Ergüsse (z.B. Aszites, Pleuraerguss), oder ein klinisch relevanter Blutverlust
- Interstitielle Pneumonie oder Lungenfibrose
- Vergangene oder aktuelle Thrombosen oder Gerinnungsstörungen
- Einnahme von Begleitmedikation für nachrangige Indikationen mit bekannter Hepato- oder Nephrotoxizität (z.B. Aminoglykosidantibiotika)
- Schwerwiegende (CTC Grad 3 - 4) und unkontrollierte, gleichzeitig auftretende Infektionen
- Vergangener Alkohol- oder Drogenabusus
- Positiver serologischer Test auf Viren (z.B. Nachweis von HBsAg und Antikörper gegen HCV, HIV1, HIV2, CMV und EBV)
- Zustände, die der im Protokoll definierten "Dosislimitierenden Toxizität" entsprachen
- Teilnahme an anderen experimentellen Studien innerhalb von 30 Tagen vor Behandlungsbeginn

Eingeschlossen wurden 43 Patienten, von denen 38 mindestens eine Infusion der Prüfmedikation bekamen. Ein Patient zog seine Einverständniserklärung zurück, zwei Patienten mussten als "Screening Failures" angesehen werden und wurden wieder ausgeschlossen. Bei einer Patientin kam es aufgrund des Voranschreitens ihrer Erkrankung schon vor der Behandlung zu einem schwerwiegenden unerwünschten Ereignis, das zum Ausschluss der Patientin aus der Studie führte. Ein Patient verstarb bereits vor Beginn der Therapie.

#### 2.2.5 Blutentnahmen und Plasmagewinnung

Am Tag der Behandlung wurde den Patienten innerhalb von 24 Stunden zu 14 Zeitpunkten peripher venöses Blut mit einer 7,5ml EDTA-Monovette abgenommen. Zu Beginn der Studie wurden bei den ersten drei Patienten seitens der Studienleitung einige dieser Zeitpunkte angepasst und abgeändert. Ab dem neunten Patienten wurden die Abnahmen eine Stunde nach Start (nIS) und eine Stunde nach Ende (nIE) der Infusion gestrichen und durch Abnahmen 25 und 26 Stunden nach Infusionsstart ersetzt, um die terminale Halbwertszeit besser beschreiben zu können (s. Tab. 2.4).

**Tab. 2.4 Zeitpunkte der Blutentnahmen**

Patient #01-01	0h, 1h, 2h, 3h, 5' vor IE, 5' nIE, 15' nIE, 30' nIE, 45' nIE, 1h nIE, 2h nIE, 4h nIE, 8h nIE, 24h nIS
Patient #01-02 und Patient #02-01	0h, 30' nIS, 60' nIS, 90' nIS, 30' vor IE, 5' n IE, 15' nIE, 30' nIE, 45' nIE, 1h nIE, 2h nIE, 4h nIE, 8h nIE, 24h nIS
Patient #01-03 bis Patient #01-07	0h, 30' nIS, 60' nIS, 90' nIS, 3:30h nIS, 5' n IE, 15' nIE, 30' nIE, 45' nIE, 1h nIE, 2h nIE, 4h nIE, 8h nIE, 24h nIS
ab Patient #01-08	0h, 30' nIS, 90' nIS, 3:30h nIS, 5' nIE, 15' nIE, 30' nIE, 45' nIE, 2h nIE, 4h nIE, 8h nIE, 24h nIS, 25h nIS, 26h nIS

Die gefüllten EDTA-Monovetten wurden bis zur Weiterverarbeitung in Eis transportiert und gelagert.

## 2.2.6 Sammlung von Urin

Die Sammlung des Urins erfolgte 24 Stunden über den gesamten ersten Behandlungstag des ersten Zyklus. Mit der Änderung der Blutentnahmezeitpunkte wurde auch sie auf ebenfalls 26 Stunden ausgeweitet. Zur Sammlung des Urins wurden den Patienten 1l-Kunststoffbehälter zur Verfügung gestellt. In jeden Behälter wurden ca. 6 - 8g des Phosphatpuffer-Salzgemisches (s. Kap. 2.1.3) vorgelegt. Anschließend wurde das Leergewicht jedes Behälters auf der Laborwaage bestimmt und auf den Behältern vermerkt. Die Patienten waren angehalten den Zeitpunkt der Urinabgabe auf den Behältern zu notieren. Durch erneutes Wiegen und anschließendes Subtrahieren des Leergewichtes konnte das Urinvolumen abgeschätzt werden. Gefüllte Behälter wurden nicht gekühlt und durchgehend bei Raumtemperatur (RT) aufbewahrt.

## 2.3 Bestimmung der Konzentration von TriN2755 und seinen Metaboliten in Plasma und Urin

### 2.3.1 Stammlösungen der Referenzsubstanzen

Per Feinwaage wurden jeweils ca. 2mg Substanz in ein Cryovial eingewogen. Dabei wurden Leergewicht und Einwaage durch drei aufeinanderfolgende Messungen mit demselben Ergebnis bestimmt. Der Einwaage entsprechend wurde so viel DMSO hinzu pipettiert, dass eine Lösung mit einer Konzentration von 2mg/ml entstand. Die Stammlösungen wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

### 2.3.2 Qualitätskontrollproben

Als Qualitätskontrollproben dienten wässrige Lösungen mit den Konzentrationen 5ng/ml, 50ng/ml und 500ng/ml, in denen jeweils TriN2755, TriN2758 (s. Kap. 2.1.1) und alle

weiteren Referenzsubstanzen enthalten waren. Ausgegangen wurde von einer Lösung mit einer Konzentration von 1000ng/ml jeder Substanz. Dafür wurden 49,7ml bidestilliertem Wasser in einem 50ml Probenröhrchen jeweils 25µl jeder Stammlösung zugesetzt. Durch Verdünnen im Verhältnis 1:2 wurden 500ng/ml erhalten. Anschließend wurden 5ml dieser Lösung 1:10 verdünnt und so 50ng/ml erhalten. Ein dritter Verdünnungsschritt von 5ml im Verhältnis 1:10 ergab schließlich eine Konzentration von 5ng/ml. Die durch das Verdünnen erhaltenen Lösungen wurden dann zu je 3ml in 5ml-Röhrchen aliquotiert und bei -32°C gelagert.

### 2.3.3 Aufarbeitung von Plasmaproben

Die Probenaufarbeitung erfolgte mittels Festphasenextraktion unter Verwendung einer Chromabond Vakuumextraktionskammer. Der Deckel wurde mit Durchflusshähnen, Auslaufnadeln und Oasis HLB-Säulen bestückt. Vor Gebrauch mussten die Säulen ohne Vakuum konditioniert werden. Dazu wurden zuerst 3ml MeOH und anschließend 3ml bidestilliertes Wasser aufgegeben. Frisch entnommene Blutproben in EDTA-Monovetten wurden bei 2000g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und das Plasma mit einer Pipette abgenommen. Gefrorene Plasmaproben wurden nach nicht forciertem Auftauen ca. 30 Sekunden auf dem Vortex-Schüttler durchmischt und bei 2500g und RT für 10 Minuten zentrifugiert. Auf die konditionierten Säulen wurden 3ml Plasma aufgetragen und anschließend mit 3ml MeOH 5% gespült. Wurden weniger als 3ml aufgetragen, resultierte dies in einem entsprechenden Verdünnungsfaktor, der bei der Auswertung berücksichtigt wurde. Zum Trocknen der Säulen wurde dann kurz das Vakuum angelegt. Vor dem Eluieren wurde die Kammer mit MeOH gereinigt und die Auslaufnadeln von außen trocken getupft. Ein Einsatz, der entsprechend der Probenanzahl 5ml-Röhrchen enthielt, wurde in der Kammer platziert und der Deckel so aufgesetzt, dass die Nadeln in die Röhrchen zeigten. Zum Eluieren wurden 5ml MeOH aufgetragen und kurz mit Vakuum angesaugt. Nachdem das MeOH die Säulen passiert hatte, wurde das Vakuum erneut angelegt und die Säulen trocken gesaugt. Auf die 5ml-Röhrchen wurden mittels einer Kanüle präparierte Lamellenstopfen aufgesetzt und das Eluat im Vakuumkonzentrator zur Trockne eingedampft. Sollten die Proben innerhalb von zwei Stunden getrocknet werden, wurde dies bei 60°C durchgeführt. Das Trocknen über Nacht fand bei RT statt. Nach dem Trocknen wurde gewartet bis die 5ml-Röhrchen wieder auf RT abgekühlt waren. Zur Trockne wurden jeweils 500µl MeOH 20% pipettiert und eine Minute auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Nach kurzem Anzentrifugieren wurden die Lösungen in Centrifree Ultrafiltrationseinheiten überführt und diese für 30 Minuten bei 2000g und leichter Kühlung bei ca. 10°C zentrifugiert. Von dem Filtrat wurden zwei Mal 230µl in

HPLC-Braunglasflaschen mit Mikroeinsatz überführt. Die Braunglasflaschen wurden entweder zur direkten Messung in den Probengeber der HPLC-Anlage gestellt oder zur späteren Analyse bei -32°C eingefroren.

#### 2.3.4 Aufarbeitung von Urinproben

Die Aufarbeitung des Urins verlief analog zur Aufarbeitung der Plasmaproben. Handelte es sich um Proben, die von Patienten abgegeben wurden, wurde der pH-Wert mittels pH-Meter bestimmt und wenn nötig mit Puffersalzgemisch annähernd auf pH 7 gebracht. Darauf folgten die Aufarbeitung und das Abfüllen von Rückstellproben, die durch den neutralen pH-Wert stabilisiert werden sollten. Ab Patient #01-29 wurden alle Urinproben der Patienten aus Arm A vor dem Auftragen auf die Säulen 1:10 verdünnt, indem 5ml Urin zu 45ml bidestilliertem Wasser gegeben und auf dem Vortex-Schüttler gemischt wurden. Dies sollte das Überschreiten der Kapazität der HLB-Säulen sowie das Erreichen des Detektorlimits verhindern und wurde bei der Analyse als Verdünnungsfaktor berücksichtigt. Urinproben, die vor Start der Infusion abgegeben wurden, wurden ebenfalls verdünnt.

#### 2.3.5 Erstellung von Kalibriergeraden

Zur späteren Auswertung der analysierten Proben wurden Kalibrierstandards aus frischem EDTA-Plasma bzw. Urin von Mitarbeitern des PAS-Labors hergestellt. Nach Zusatz der Analyten und der nachfolgenden Verdünnungsschritte erfolgte auch mit den Standardproben die Aufarbeitung mittels HLB-Säulen. Es wurde mit Kalibriergeraden begonnen, die den Bereich von 1ng/ml - 500ng/ml umfassten. Aufgrund der Dosisescalation von TriN2755 wurden neue Kalibriergeraden für den Messbereich von 2,44ng/ml - 5.000ng/ml erstellt. Dazu wurde aus Plasma bzw. Urin und den Referenzsubstanzen in DMSO eine Lösung mit 10.000ng/ml jeder Substanz hergestellt. Diese wurde dann in zwölf Schritten sukzessive mit Plasma 1:2 verdünnt. Nach der Messung der erstellten Standardproben wurde dem detektierten Signal mit Hilfe der Software Empower2 die entsprechende Sollkonzentration zugewiesen und aus den resultierenden Wertepaaren die Kalibriergeraden berechnet. Dies wurde nacheinander für den PDA und alle verwendeten Einzelionendetektionen durchgeführt. Konnten die Kalibriergeraden aufgrund von Reparatur- und Wartungsmaßnahmen an den Messgeräten nicht weiter verwendet werden, musste die Prozedur für die Erstellung neuer Kalibriergeraden wiederholt werden.

#### 2.3.6 Chromatographie/HPLC

Die Messung der Patientenproben erfolgte mittels eines HPLC 2695 Separations Module der Firma Waters. Als Trennsäule wurde eine EC Nucleodur C<sub>18</sub> Isis Säule (250 x 4mm) mit

zugehöriger CC Nucleodur C<sub>18</sub> Isis Vorsäule (8 x 4mm) der Firma Macherey-Nagel verwendet. Im Säulenofen wurde die Säule dauerhaft auf 40°C temperiert. Der Probengeberraum wurde auf 4°C gekühlt. Als Fließmittel kamen auf Linie B Ameisensäure 0,1%, auf Linie C MeOH und auf Linie D Acetonitril zum Einsatz. Die Analyse erfolgte bei einem Fluss von 1ml/min über 40 Minuten mittels eines Fließmittelgradienten. Dabei wurde der Anteil von ACN konstant bei 20% gehalten. Initial wurden 77% Ameisensäure 0,1% gefördert und 3% MeOH. Im Verlauf der Messung stieg der MeOH-Anteil in zwei Schritten (s. Abb. 16) auf 70%, so dass der organische Anteil des Fließmittelgemisches 90% betrug. Die Ausgangsbedingungen wurden innerhalb von 3 Minuten wieder hergestellt und 5 Minuten zur Reequilibrierung der Säule gehalten. Hinter der Säule befand sich ein T-Stück, welches den Fließmittelstrom im Verhältnis 9:1 auf den zur Detektion verwendeten PDA und das Massenspektrometer aufteilte. Standardmäßig wurden bei jeder Messung 200µl der Probe injiziert. Kam jedoch mindestens einer der beiden Detektoren an die obere Nachweisgrenze, wurde eine zweite Messung durchgeführt, bei der nur 5µl der Probe gemessen wurden.

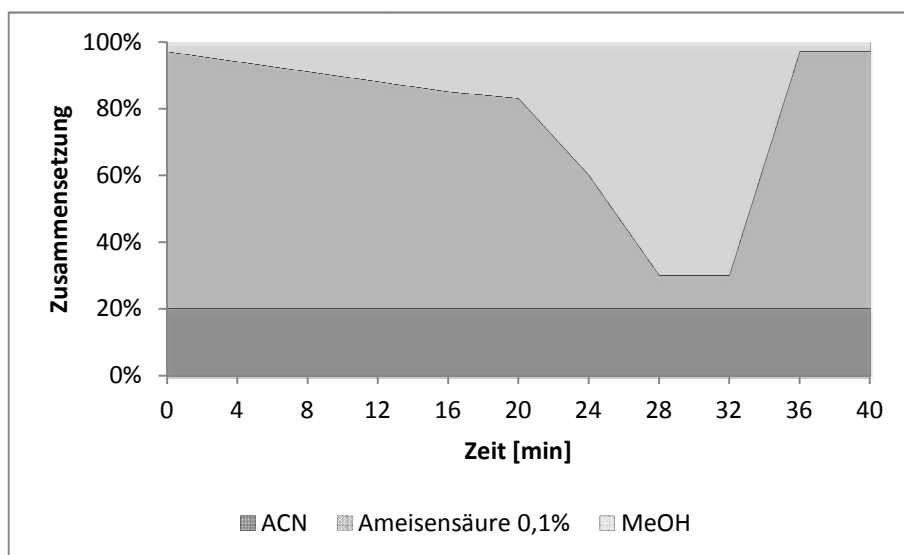


Abb. 16 Fließmittelgradient zur Analyse von TriN2755 und seinen Metaboliten

### 2.3.7 PDA-Detektion

Der PDA-Detektor 2998 der Firma Waters zeichnete während der gesamten Messzeit ein 3D-Spektrum aller Wellenlängen im Bereich von 200 - 400nm auf. Zur Auswertung wurde das Chromatogramm mit der Wellenlänge 300nm mit der Software Empower2 extrahiert.

### 2.3.8 MS-Detektion

Das Micromass ZQ 2000 Massenspektrometer der Firma Waters arbeitete im Elektrospray-Ionisationsmodus und detektierte positiv geladene Ionen. Die Ionenquelle war auf 125°C temperiert. Die Desolvatisierung erfolgte bei 250°C und einem Stickstoff-Gasfluss von

500l/h. An der Kapillare lagen 3,40kV an. Am Konus („Cone“), dem Durchlass zum Inneren des Massenspektrometers, wurden vier der sechs aufgezeichneten Chromatogramme mit einer Spannung von 50V gemessen, die anderen Beiden mit 47V bzw. 70V. Zur Detektion und Quantifizierung von TriN2755 und aller weiteren Referenzsubstanzen wurden bei jeder Messung sechs Chromatogramme per Einzelionendetektion (SIR) aufgezeichnet, bei denen Ionen unterschiedlicher Massen-Ladungsverhältnisse (m/z) detektiert wurden.

**Tab. 2.5 Einzelionendetektion der Referenzsubstanzen**

Masse-Ladungsverhältnis	Cone-Spannung	Detektierte Analyten
SIR 193	50V	Comp4, Comp5, Imp1, Imp7
SIR 198	70V	Comp5, Comp6, Imp2, TriN2755, TriN2758
SIR 214	50V	Imp3, Imp10
SIR 215	50V	Imp4
SIR 256	50V	Imp8
SIR 270	47V	Comp5, Comp6, Imp2, TriN2755, TriN2758

Ursprünglich wurde diese Methode für die hier aufgelisteten Analyten (s. Tab. 2.5), mit Ausnahme von Comp6, entwickelt und validiert. Im Rahmen dieser Arbeit gefundene und mittels MS identifizierte, neue Verbindungen wurden in die Methode integriert, wodurch sich die Anzahl der Analyten nach und nach vergrößerte. Da bei der Identifizierung neuer Metaboliten jedoch nicht nach einem einheitlichen Schema vorgegangen werden konnte, wurde dies für jede neue Substanz bzw. neue Substanzklasse in Kapitel 3.6 aufgeführt.

## 2.4 In vitro Versuche an humanen Leukozyten mit TriN2755

Zu Beginn der Studie wurde an humanen Leukozyten eines gesunden Spenders überprüft ob und in welchem Maße TriN2755 zur Adduktbildung an der DNA dieser Zellen führte. Dazu wurden Leukozyten mit TriN2755 inkubiert, die DNA extrahiert und photometrisch quantifiziert. Nach saurer thermischer Hydrolyse wurden die entstandenen DNA-Addukte per HPLC analysiert. Aus den Überständen der Inkubation wurden ebenfalls per HPLC die Spiegel an TriN2755 sowie die in Gegenwart der Leukozyten entstandenen Metaboliten untersucht.

### 2.4.1 Gewinnung humaner Leukozyten

Einem Mitglied der Arbeitsgruppe wurden 180ml Vollblut mittels 9ml EDTA-Monovetten entnommen. Diese wurden für 15 Minuten bei 2000g und 4°C zentrifugiert und das Plasma abgenommen. Die sedimentierten Zellen wurden in den Monovetten mit PBS wieder auf etwa 9ml aufgefüllt. Zum Abtrennen der Leukozyten von den restlichen Blutbestandteilen wurden 5ml Polymorphprep in 15ml Probengefäßen vorgelegt und jeweils 9 - 10ml des Blut-PBS



Gemisches darüber geschichtet. Anschließend wurde für insgesamt 40 Minuten bei 500g und RT zentrifugiert. Danach waren zwei Zellringe sichtbar, von denen einer hauptsächlich polymorphkernige Leukozyten bzw. Granulozyten und der andere Lymphozyten, Monozyten sowie basophile Granulozyten enthielt. Beide Ringe aller Gefäße wurden mit einer Einmalpipette abgenommen und in einem 50ml Probengefäß vereinigt. Die Zellen wurden für 5 Minuten mit 1000g bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Waschen des Zellpellets wurde das Probenröhrchen mit PBS aufgefüllt, nochmals mit den selben Einstellungen zentrifugiert und die Waschlösung verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 18ml PBS aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe eines Beckman Coulter Counter auf  $5,3 \times 10^7$  Zellen/ml bestimmt. Nach erneutem Zentrifugieren und Verwerfen des PBS erfolgte die Einstellung der Zellzahl auf  $5,0 \times 10^7$  Zellen/ml durch die Zugabe von 19,08ml PBS.

#### 2.4.2 Inkubation mit TriN2755

7ml der hergestellten Zellsuspension wurden in einem 15ml Probenröhrchen mit 35µl einer wässrigen 10mg/ml-Lösung von TriN2755 versetzt, so dass sich im Ansatz 50µg/ml TriN2755 befanden. Die Zellen wurden anschließend bei 37°C im Rotationsofen inkubiert. Zu den Zeitpunkten 1h, 2h, 3h, 4h, 20h und 26h wurde jeweils 1ml der Suspension entnommen und in ein 2ml Safe-Lock Tube überführt. Diese wurden dann für 10 Minuten bei 1000g und RT zentrifugiert. Die Überstände wurden zur photometrischen Bestimmung der TriN2755-Spiegel sowie der gebildeten Metaboliten verwendet. Die Zellpellets wurden mit 1ml PBS gewaschen und die DNA der Zellen extrahiert. Zur Kontrolle wurde dies ebenfalls mit einer wässrigen, zellfreien TriN2755-Lösung gleicher Konzentration sowie 1ml der TriN2755 freien Zellsuspension durchgeführt.

#### 2.4.3 DNA-Extraktion

Zur Extraktion der DNA wurden die sieben vorliegenden Zellpellets 60 Minuten mit 800µl Lysepuffer bei 56°C inkubiert. Es wurden 25µl RNase A 20mg/ml-Lösung zum Abbau der nun in der Lösung vorliegenden RNA zugegeben, da diese sonst die spätere Messung hätte stören können. Danach wurde für weitere 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in Phase Lock Gel-Röhrchen überführt, 850µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung zugesetzt und für 7 Minuten bei 15000g und RT zentrifugiert. Die obere Phase, in der sich die DNA angereichert hatte, wurde abgenommen und in ein neues Probengefäß überführt. Zum Fällern der DNA wurden jeder Probe 1980µl -20°C kalter Ethanol zugesetzt und die Proben eine Stunde bei -20°C gelagert. Danach wurde mit 2000g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die daraus resultierenden

DNA-Pellets wurden mit Ethanol 70% gewaschen und zur weiteren Aufarbeitung an der Luft getrocknet.

#### 2.4.3.1 Neutrale thermische Hydrolyse

Durch die neutrale thermische Hydrolyse erfolgte die Auftrennung der DNA in Einzelstränge. Dazu wurde jedes der DNA-Pellets mit 200µl bidestilliertem Wasser und 10µl PBS versetzt und für 30 Minuten bei 95°C inkubiert. Dies hatte zur Folge, dass neben verschiedenen langen Einzelsträngen auch einige der gebildeten DNA-Addukte wie N<sup>7</sup>-Methylguanin freigesetzt werden konnten. Zudem ließ sich die hydrolysierte DNA besser pipettieren als die zuvor vorliegenden DNA-Doppelstränge.

#### 2.4.3.2 Saure thermische Hydrolyse

Jeweils 100µl der neutral thermisch hydrolysierten Proben wurden vor der HPLC-Messung zusammen mit 2µl HCl 5N für weitere 30 Minuten bei 95°C inkubiert. Damit sollte die Freisetzung aller Adenin- und Guaninbasen bewirkt werden. Zusätzlich bestand die Möglichkeit weitere DNA-Addukte wie das O<sup>6</sup>-Methylguanin freizusetzen, die über die neutral thermische Hydrolyse nicht zugänglich waren.

#### 2.4.4 Photometrische Messung des DNA-Gehaltes

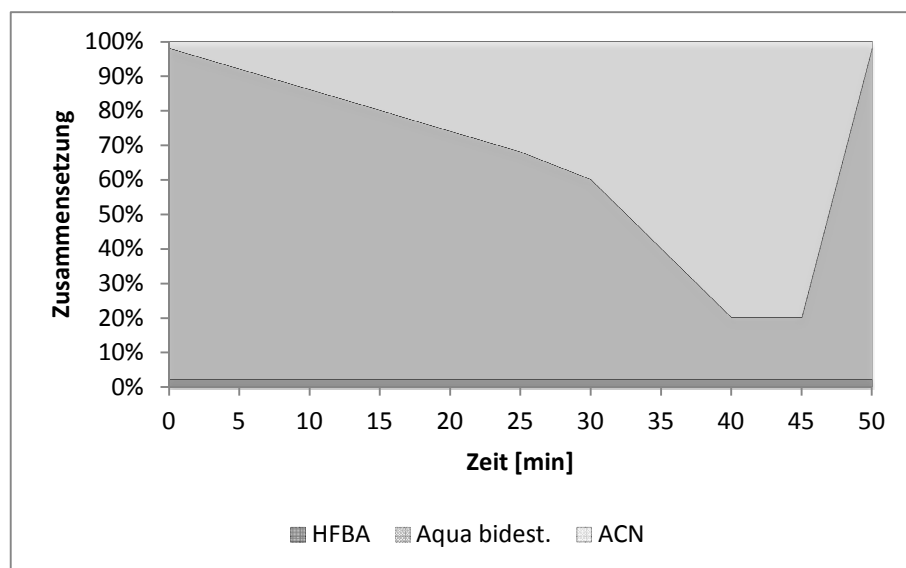
10µl der neutral thermisch hydrolysierten Proben wurden zur Quantifizierung des DNA-Gehaltes zusammen mit 190µl bidestilliertem Wasser in eine micro-UV-Küvette gegeben. Die Messung erfolgte in einem UV-2450 Photometer der Firma Shimadzu. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 260nm zum Erfassen der DNA-Basen. Über voreingestellte Parameter in der zugehörigen Software „UV Probe“ wurde der DNA-Gehalt anhand der gemessenen Absorption anschließend automatisch errechnet.

#### 2.4.5 Fluorimetrische Bestimmung der DNA-Addukte

##### 2.4.5.1 HPLC

Vor der Messung per HPLC wurden sowohl die neutral als auch die sauer thermisch hydrolysierten Proben über eine Amicon Ultrafiltrationseinheit gegeben, um so die einzelnen Basen von größeren Fragmenten zu trennen. Anschließend wurde das Filtrat mit einem HPLC 2695 Separations Modul der Firma Waters gemessen. Zur Trennung wurde eine Symmetry C<sub>18</sub>-Säule (250 x 4,6mm) mit zugehöriger C<sub>18</sub>-Vorsäule (20 x 3,9mm) der Firma Waters verwendet. Die Temperatur der Säule wurde über den Säulenofen konstant bei 30°C gehalten. Die Temperatur des Probengeberraums betrug 20°C. Die Analysen erfolgten über 50 Minuten mit einem Fluss von 1ml/min mittels Fließmittelgradient. Auf Linie B befand sich HFBA 1%,

deren Anteil über die gesamte Messzeit konstant gehalten wurde. Auf Linie A befand sich filtrierte bidestilliertes Wasser und auf Linie C ACN, dessen Anteil initial nur 2% betrug, aber nach 40 Minuten Laufzeit für 5 Minuten auf 80% anstieg (s. Abb. 17).



**Abb. 17** Fließmittelgradient zur Analyse von DNA-Addukten

#### 2.4.5.2 Fluoreszenz-Detektion

Zur Detektion von Adenin und Guanin sowie der DNA-Addukte wurde ein W474 Fluoreszenzdetektor der Firma Waters verwendet. Die Anregung der Analyten erfolgte bei Wellenlänge 270nm. Die anschließende Emission wurde bei 360nm gemessen.

#### 2.4.5.3 Stammlösungen

Von den als Referenz vorliegenden Substanzen Adenin, 3-Methyladenin, N<sup>6</sup>-Methyladenin, Guanin, O<sup>6</sup>-Methylguanin, 7-Methylguanin und 9-Methylguanin wurden auf der Feinwaage jeweils ca. 1,5mg in ein Cryovial eingewogen. Die leeren und gefüllten Cryovials wurden so lange wiederholt gewogen, bis drei aufeinanderfolgende Messungen dasselbe Gewicht lieferten. Der Einwaage entsprechend wurde so viel HCl 0,1N hinzu pipettiert, dass von jeder Substanz eine Stammlösung mit der Konzentration 1mg/ml vorlag.

#### 2.4.5.4 Kalibriergeraden

Zur Quantifizierung der DNA-Addukte wurden mit Hilfe der Stammlösungen Kalibriergeraden erstellt. Da die einzelnen Substanzen unterschiedlich sensitiv mit dem Fluorimeter erfasst wurden, wurde dies bereits bei der Verdünnungsreihe berücksichtigt. Als Lösungsmittel und für die Verdünnungsschritte wurde HFBA 0,1% verwendet, da es in der HPLC die Peakschärfe verbesserte. Die Ausgangslösung enthielt die in Tabelle 2.6 aufgeführten Komponenten und Konzentrationen:

**Tab. 2.6 Ausgangslösung der Verdünnungsreihe**

Analyt	Konzentration
3-Methyladenin	200µg/ml
N <sup>6</sup> -Methyladenin	200µg/ml
Adenin	20µg/ml
Guanin	10µg/ml
N <sup>7</sup> -Methylguanin	10µg/ml
9-Methylguanin	2µg/ml
O <sup>6</sup> -Methylguanin	1µg/ml

Bei den anschließenden zwölf Verdünnungsschritten wurde sich an der Konzentration von Guanin orientiert und so verdünnt, dass die erhaltene Lösung am Ende eine Guaninkonzentration von 1ng/ml aufwies.

#### 2.4.6 Photometrische Bestimmung der Metabolit-Konzentrationen

Die im Rahmen der Zellinkubation erhaltenen Zellüberstände wurden analog zu den Plasma- und Urinproben der Patienten aufgearbeitet. Zuvor wurden sie jedoch im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt und anschließend 500µl der verdünnten Lösung auf die HLB-Säulen aufgetragen und wie beschrieben für die Messung per HPLC vorbereitet.

### 2.5 Validierung

Um sicherzustellen, dass die für die Analyse von TriN2755 und seiner Metaboliten verwendeten Methoden zur Aufarbeitung und Messung verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse lieferten, wurde der gesamte Prozess anhand der Vorgaben einschlägiger Literatur (U.S. Food and Drug Administration 2001; Shah et al. 1992) validiert. Dazu mussten folgende Parameter der Methode überprüft werden: Richtigkeit, Präzision, Selektivität und Stabilität sowie die Nachweisgrenzen und der Messbereich, für den die zuvor genannten Parameter Gültigkeit besaßen. Die Herstellung der Stammlösungen, Prozessierung der Proben und das analytische System wurden bereits im Kapitel 2.3 beschrieben.

#### 2.5.1 Linearität (Kalibriergerade)

Für die Quantifizierung mit dem Massenspektrometer wurde aus EDTA-Plasma und den Stammlösungen eine Lösung mit einer Konzentration von jeweils 500ng/ml pro Substanz hergestellt. Die Verdünnung erfolgte in unterschiedlichen Verdünnungsschritten bis zu einer Konzentration von 0,5ng/ml. Für die photometrische Detektion wurde ein größerer Bereich gewählt. Es wurde mit einer Konzentration von jeweils 1.000ng/ml begonnen und durch 1:2-

Verdünnungsschritte bis zu einer Konzentration von 1,95ng/ml verdünnt. Die Berechnung der Geraden für die Detektion mit MS und PDA erfolgte wie beschrieben (s. Kap. 2.3.5).

### 2.5.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode gab an wie stark die Messwerte vom wahren Wert abwichen. Zur Bestimmung wurden Lösungen verschiedener Konzentrationen hergestellt, die anschließend mindestens zweimal gemessen wurden. Aus den Messwerten wurde für jede Konzentration der Mittelwert ( $\bar{x}$ ) sowie die absolute (s) und die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient V) ermittelt. Zur Bewertung der Richtigkeit wurde der relative Fehler (f) bzw. die relative Abweichung des Mittelwerts vom Sollwert (richtiger Wert  $x_r$ ) mit folgender Formel berechnet:

$$f = \frac{\bar{x} - x_r}{x_r} \cdot 100\%$$

Die relative Abweichung durfte nur maximal 15% betragen. An der unteren Quantifizierungsgrenze (lower limit of quantification, LLQ), die anhand der Messergebnisse der Genauigkeits- und Präzisionsmessungen abgeschätzt wurde, war eine Abweichung von bis zu 20% erlaubt.

#### 2.5.2.1 Richtigkeit der MS-Detektion

Die Stammlösungen von TriN2755 und seinen Metaboliten wurden in Plasma verdünnt, so dass eine Lösung mit einer Konzentration von jeweils 400ng/ml entstand. Es erfolgte die Verdünnung mit weiterem Plasma bis zu einer Konzentration von 0,375ng/ml. Aus dem gesamten Konzentrationsbereich wurden die Verdünnungsschritte nach dem oben beschriebenen Verfahren aufgearbeitet, die daraus erhaltenen Proben wiederholt gemessen und mit Hilfe von massenspektrometrischer Detektion die Konzentrationen ermittelt.

#### 2.5.2.2 Richtigkeit der PDA-Detektion

Für die Verwendung des PDA wurde eine Lösung mit einer Konzentration von je 1000ng/ml jeder Substanz hergestellt. Mit Plasma wurde 1:2 bis zu einer Konzentration von 1,95ng/ml verdünnt. Da der Konzentrationsbereich bis 400ng/ml vor allem durch die massenspektrometrische Detektion abgedeckt werden sollte, wurden alle darunter liegenden Konzentrationen nur jeweils zwei Mal gemessen. Die Konzentration von 500ng/ml wurde dafür jedoch acht Mal gemessen. Zusätzlich wurde auch im Hinblick auf die Bestimmung der oberen Quantifizierungsgrenze (upper limit of quantification, ULQ) (s. Kap. 2.5.4) sowie der Präzision (s. Kap. 2.5.3) eine weitere Lösung der Referenzsubstanzen in Plasma hergestellt. Die Konzentrationen der einzelnen Analyten reichten von 2.500ng/ml bis 100.000ng/ml für

TriN2755 (s. Tab. 2.7). Sie wurden anhand der Ergebnisse der präklinischen Untersuchung gewählt, da bei den Proben der Patienten ähnliche Verhältnisse vermutet wurden. Diese Lösung wurde ohne weitere Verdünnungsschritte sechs Mal gemessen.

**Tab. 2.7 Zusammensetzung der Lösung für die Bestimmung von Richtigkeit, Präzision und ULQ**

Referenzsubstanz	Konzentration [ng/ml]	Referenzsubstanz	Konzentration [ng/ml]
Imp1	5.000	Imp10	2.500
Imp2	2.500	Comp4	5.000
Imp3	20.000	Comp5	2.500
Imp4	20.000	TriN2755	100.000
Imp7	2.500	TriN2758	2.500
Imp8	5.000		

### 2.5.3 Präzision

Die Präzision war ein Maß für die Streuung von Messwerten bei wiederholter Bestimmung. Um die Präzision der gesamten Methode anzugeben, musste nicht nur die Messung selbst, sondern auch die Probenvorbereitung und -aufarbeitung wiederholt werden. Mit Hilfe der relativen Standardabweichung bzw. dem Variationskoeffizienten konnte eine Aussage über die Präzision getroffen werden. Sie wurde nach folgender Formel berechnet:

$$V = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

Um eine präzise Analyse sicherzustellen, durften die errechneten Werte nicht über 15% liegen. An der unteren Quantifizierungsgrenze durfte die relative Standardabweichung maximal 20% betragen.

#### 2.5.3.1 Präzision der MS-Detektion

Durch Verdünnung mit Plasma wurde aus den Stammlösungen sechs Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt. Jede dieser Lösungen wurde sechs Mal angesetzt, jeweils einzeln aufgearbeitet und gemessen. Die Bewertung der Präzision erfolgte ausschließlich mit MS-Daten. Die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen ist in Tabelle 2.8 dargestellt.

**Tab. 2.8 Zusammensetzung der Lösungen für die Bestimmung der Präzision mit massenspektrometrischer Detektion**

Substanz	Lösung [ng/ml]					
	A	B	C	D	E	F
Imp1	4	20	500	150	15	1000
Imp2	3	20	400	150	15	75
Imp3	3	20	400	150	15	650
Imp4	3	20	400	150	15	750
Imp7	5	25	500	150	15	650
Imp8	2	15	300	150	15	500
Imp10	10	50	650	300	50	1.000
Comp4	5	25	500	150	15	650
Comp5	4	20	500	75	10	30
TriN2755	3	20	400	100	10	30
TriN2758	3	20	400	125	12,5	40

#### 2.5.3.2 Präzision der PDA-Detektion

Hierfür wurden vier verschiedene Lösungen der Referenzsubstanzen jeweils sechs Mal hergestellt (s. Tab. 2.9). Zusätzlich wurden sechs Lösungen, mit der für die Richtigkeit verwendeten Zusammensetzung (s. Kap. 2.5.2.2) auch für die Bewertung der Präzision analysiert.

**Tab. 2.9 Zusammensetzung der Lösungen für die Bestimmung der Präzision mit photometrischer Detektion**

Substanz	Lösung [ng/ml]			
	A	B	C	D
Imp1	12,5	150	450	1000
Imp2	12,5	125	350	70
Imp3	17,5	150	350	650
Imp4	12,5	150	350	750
Imp7	20	150	450	600
Imp8	7,5	150	300	500
Imp10	50	300	600	1000
Comp4	12,5	150	450	650
Comp5	8	50	400	25
TriN2755	20	225	350	25
TriN2758	20	100	350	40

#### 2.5.4 Quantifizierungs- und Detektionsgrenze

Die Detektionsgrenze war die Konzentration, bei der eine Substanz noch sicher nachgewiesen werden konnte, sich also noch eindeutig vom Hintergrundrauschen abhob. Zur Bestimmung

der Detektionsgrenze erfolgte die Verdünnung zu Konzentrationen, die unter denen für die Erstellung der Kalibriergerade lagen. Die nach der Messung erhaltenen Signale wurden auf ihr Signal-Rausch-Verhältnis überprüft. Bei einem Verhältnis von mindestens 3:1 handelte es sich noch um ein detektierbares Signal.

Die Quantifizierungsgrenze bezeichnete die Konzentration, die gerade noch mit akzeptabler Präzision und Genauigkeit quantifiziert werden konnte. Die untere Quantifizierungsgrenze wurde ebenfalls mit Hilfe oben genannter Proben bestimmt. Da sich mit dem Massenspektrometer im direkten Vergleich zum PDA jedoch sensitiver messen ließ, wurden die LLQs für jede Substanz nur anhand der MS-Daten festgelegt. Die Ermittlung der oberen Quantifizierungsgrenze erfolgte dagegen über die photometrische Detektion der dafür hergestellten Lösung.

#### 2.5.5 Selektivität/Spezifität

Die Spezifität und die Selektivität der Methode gab an, ob die Methode geeignet war einen, bzw. mehrere Analyten aus der Probenmatrix heraus ohne Störungen durch die anderen Bestandteile zu identifizieren. Dazu wurde Plasma von sechs verschiedenen Spendern ohne Zusatz der Analyte aufgearbeitet und vermessen. Um Störsignale, die zur selben Retentionszeit wie die Analyte detektiert wurden zu identifizieren, wurde für die MS-Detektion eine Plasmaprobe hergestellt, die jeweils 4ng/ml und im Falle von Imp8 10ng/ml der Analyten enthielt. Für die Detektion mittels PDA wurde eine Probe mit 8ng/ml jeder Referenzsubstanz verwendet. Anschließend wurden die resultierenden Chromatogramme jedes SIRs und des PDA über das entsprechende Chromatogramm der analytfreien Plasmaproben gelegt. Die Fläche eines Störpeaks durfte maximal 20% der Fläche betragen, die das Messen einer entsprechenden Probe an der unteren Detektionsgrenze erzeugte.

#### 2.5.6 Stabilität

Die Stabilität der Analyte wurde unter verschiedenen Bedingungen getestet, um herauszufinden wie mit frischen und aufgearbeiteten Proben verfahren werden musste, wenn diese für die Messung zu einem späteren Zeitpunkt vorgesehen waren. Es sollte sichergestellt werden, dass durch die Lagerung die in einer Probe vorliegenden Konzentrationen an TriN2755 und seinen Metaboliten nicht negativ beeinflusst wurden. Deshalb wurde die Stabilität einerseits in Plasma und andererseits in fertig vorbereiteten Proben geprüft. Dazu wurden erneut Mischungen der Referenzsubstanzen in Plasma in unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt und diese dann entweder direkt oder erst nach der Aufarbeitung bei verschiedenen Temperaturen gelagert. Zu bestimmten Zeitpunkten erfolgte die Messung eines Teils dieser aufbewahrten Proben. Die erhaltenen Werte wurden dann mit einer direkt



nach der Herstellung quantifizierten Probe verglichen. Abschließend wurde überprüft ob mehrmaliges Einfrieren und Auftauen einer Plasmaprobe sich ebenfalls auf die Messergebnisse auswirken konnte. Um dies zu beurteilen, wurde aus den Messwerten (x) die prozentuale Wiederfindungsrate (W) nach folgender Formel errechnet:

$$W = \frac{x}{x_r} \cdot 100\%$$

#### 2.5.6.1 Stabilität in Plasma bei unterschiedlichen Lagerbedingungen

Aus Plasma und TriN2755 sowie seinen Metaboliten wurden drei Lösungen hergestellt. Die Konzentrationen der Analyten reichten in der ersten Lösung von 4 - 10ng/ml, in der zweiten von 25 - 50ng/ml und in der dritten von 400 - 800ng/ml. Nach der Herstellung wurde je ein Aliquot der drei Lösungen aufgearbeitet und gemessen. Weitere Plasmaaliquots wurden bei Raumtemperatur, 4°C, -20°C und -80°C gelagert und die Konzentrationen nach 7 Tagen mittels MS bestimmt. Zusätzlich wurde eine Probe mit Konzentrationen von 850 - 1000ng/ml hergestellt. Mit ihr wurde analog verfahren, es fanden jedoch 2 weitere Messungen nach 14 und nach 28 Tagen statt. Hierbei erfolgte die Auswertung aufgrund der höheren Konzentrationen nur mit dem PDA.

#### 2.5.6.2 Stabilität vorbereiteter Proben bei unterschiedlichen Lagerbedingungen

Neben den Plasmaaliquots wurden bereits aufgearbeitete und zur Messung vorbereitete Proben unter den oben genannten Bedingungen gelagert. Nach 7 bzw. 15 Tagen wurden die Proben gemessen und ihr Gehalt mit Proben, die direkt nach der Aufarbeitung gemessen wurden, verglichen. Für die Aufarbeitung wurde eine Lösung, die die Konzentrationen des LLQ enthielt und eine Lösung mit 30 - 40ng/ml jeder Substanz verwendet. Imp10 lag in dieser Lösung jedoch mit 100ng/ml vor.

#### 2.5.6.3 Stabilität in Plasma nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen

Zur Überprüfung der Stabilität der Analyte in Plasma nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen wurden Lösungen mit einer Konzentration von jeweils 50ng/ml bzw. 500ng/ml jeder Substanz hergestellt. Nach der Aufarbeitung eines Aliquots wurden die Lösungen für 7 Tage bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde ein Aliquot aufgearbeitet und die Lösungen wieder eingefroren. An den folgenden 3 Tagen wurde die Prozedur für alle Lösungen wiederholt. Jede aufgearbeitete Lösung wurde dreimal gemessen und die Mittelwerte für die Berechnung verwendet.

## **2.6 Auswertung mit TopFit**

Zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter wurde die Software TopFit 2.0 (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart) verwendet. Die Berechnungen wurden jedoch nur für TriN2755 und die beiden Metaboliten Comp4 und Comp5 durchgeführt. Als Berechnungsgrundlage dienten die für diese 3 Substanzen bestimmten Plasmaspiegel sowie die im Urin gemessenen TriN2755 Mengen. Zuerst wurde anhand einiger Datensätze geprüft mit welchem Kompartiment-Modell die Plasmaspiegelverläufe am besten erklärt werden konnten. Dazu wurde die Anpassung der Daten an ein 2- und an ein 3-Kompartiment-Modell ausprobiert. Die Verwendung eines 2-Kompartiment-Modells war zwar in einigen Fällen möglich, lieferte aber nicht für alle getesteten Datensätze zufriedenstellende Ergebnisse. Mit dem 3-Kompartiment-Modell konnte jedoch für alle Datensätze eine akzeptable Anpassung erzielt werden, so dass dieses Modell für die Auswertung der gesamten Daten verwendet wurde. Als benötigte Angabe für die Berechnung wurde die vierstündige Infusion von TriN2755 mit der entsprechenden absoluten Dosis vorgegeben. Da Comp4 und Comp5 erst im Zuge des Metabolismus von TriN2755 entstanden, wurde für den Eintritt dieser beiden Substanzen in die Blutbahn bzw. das zentrale Kompartiment eine „two-segment Absorption“ vorgegeben. Dies geschah unter der Annahme, dass erst nach der zellulären Aufnahme von TriN2755, dem dortigen Metabolismus und dem erneuten Eintritt ins Blut Comp4 und Comp5 der Messung zugänglich waren. Aus den Messdaten wurden anschließend Eliminationshalbwertszeit, mittlere Verweildauer, die maximale Konzentration sowie die AUC für jede der drei untersuchten Substanzen berechnet. Die erhaltenen Werte für die AUC beinhalteten dabei immer die Extrapolation vom Zeitwert des letzten Messwertes gegen Unendlich. Das Verteilungsvolumen im steady state sowie das zentrale Verteilungsvolumen, das den Anteil von  $V_{ss}$  darstellte, der sich im zentralen Kompartiment befand, wurden zusätzlich für TriN2755 bestimmt. Weiterhin konnte mit Hilfe der im Urin gemessenen Spiegel neben der totalen auch die renale Clearance bestimmt werden. Für die Berechnung wurde der kumulative Anteil an ausgeschiedenem TriN2755 (%Ae) jedes Patienten benötigt, der sich aus den gemessenen Spiegeln im Urin und den entsprechenden Urinvolumina ergab.

## **2.7 Statistische Methoden**

Die Beschreibung und statistische Auswertung der berechneten Daten erfolgte nach gängigen Methoden der deskriptiven und beurteilenden Statistik. Dafür wurden Excel 2003 und 2007 (Microsoft Corp., Redmond, USA) und die Statistik-Software SigmaStat 3.5 (Systat Software GmbH, Erkrath) verwendet.

### 2.7.1 Deskriptive Statistik

Folgende Lage- und Streuungsmaße wurden im Rahmen der Auswertung bestimmt:

- Arithmetisches Mittel ( $\bar{x}$ )
- Median ( $\tilde{x}$ )
- Standardabweichung ( $\sigma$ )
- Minimum und Maximum

### 2.7.2 Explorative Statistik

Da die Patienten TriN2755-Dosen von 25mg bis zu 6000mg erhalten haben, wurden die errechneten Parameter AUC und  $C_{\max}$  dosisnormiert, indem sie auf die verabreichte Dosis pro Kilogramm Körpergewicht bezogen wurden. Die Ergebnisse wurden je nach Geschlecht des Patienten auf zwei Untergruppen verteilt. Mit Hilfe des t-Tests sollte überprüft werden, ob zwischen den Mittelwerten der beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied bestand. Dazu wurde von der Software zuerst geprüft, ob die Werte beider Gruppen normalverteilt und mit gleicher Varianz vorlagen. War dies nicht der Fall, wurde stattdessen ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, der eine Aussage über das Verhältnis der Mediane der beiden Gruppen traf. Dazu wurde aus der Rangfolge aller vorliegender Zahlenwerte Summen gebildet, die in zwei Prüfgrößen einfließen. Durch Abgleich mit einem kritischen Wert, konnten so auch nicht-normalverteilte Stichproben auf signifikante Unterschiede hin untersucht werden. Von einem signifikanten Unterschied konnte jedoch erst gesprochen werden, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) unter einem Wert von 0,05 lag.

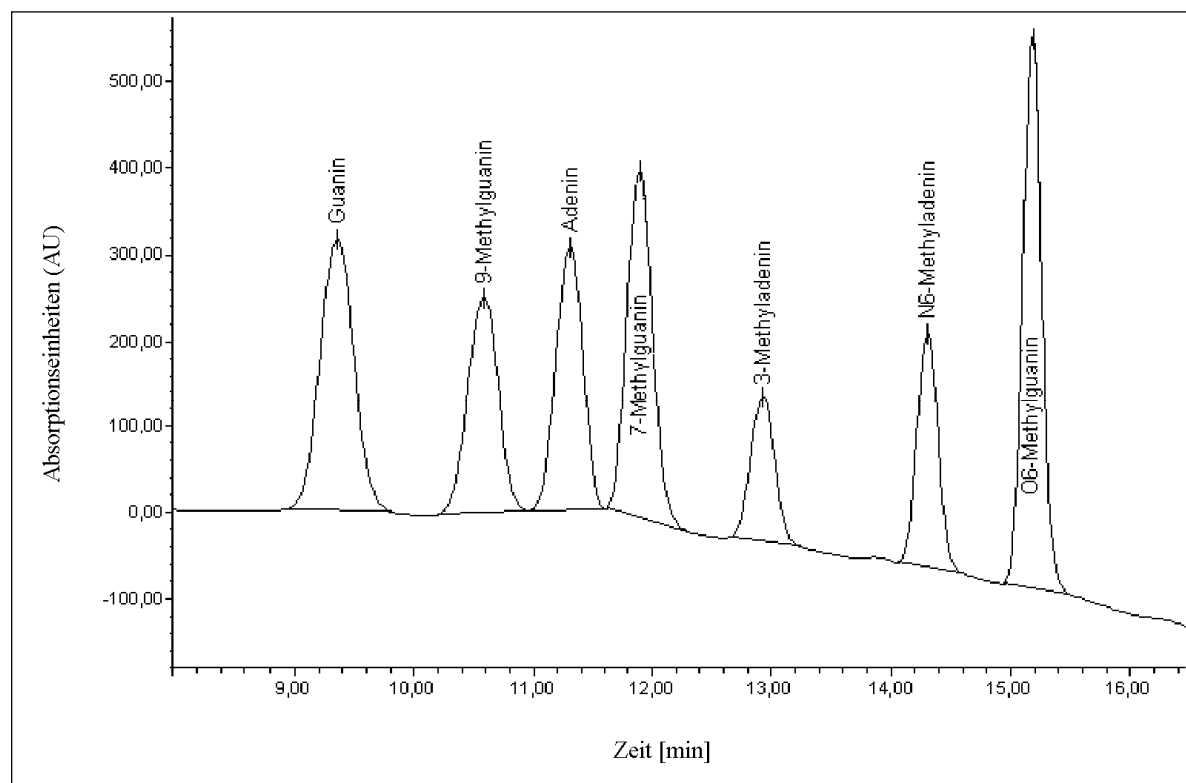
## 3 Ergebnisse

### 3.1 In vitro Versuche an humanen Leukozyten mit TriN2755

Für den Inkubationsansatz wurden 7ml der hergestellten Zellsuspension verwendet. Darin befanden sich in etwa  $1,83 \times 10^7$  Zellen, die mit 350µg in 35µl Wasser gelöstem TriN2755 versetzt wurden. Damit lag die Ausgangskonzentration zu Beginn der Inkubation bei etwa 50ng/ml. Zu den bereits genannten Zeitpunkten wurde jeweils 1ml, der etwa  $0,26 \times 10^7$  Zellen enthielt, entnommen. In jeder dieser Proben wurden die Spiegel von TriN2755 und die der Metaboliten bestimmt. Daneben wurden die DNA-Addukte nach neutral thermischer Hydrolyse gemessen. Die saure thermische Hydrolyse wurde 1h, 2h, 3h und 26h nach Beginn der Inkubation zusätzlich durchgeführt. Die Quantifizierung des DNA-Gehaltes im Photometer erfolgte nur zu den Zeitpunkten 4h und 26h.

### 3.1.1 Fluorimetrische Bestimmung der DNA-Addukte

Nach der Hydrolyse und Filtration der DNA-Proben wurden diese in entsprechende Probengefäße überführt und die Addukt- sowie Guanin- und Adeninkonzentrationen per HPLC analysiert. Ein Chromatogramm aller verwendeten Referenzsubstanzen ist in Abbildung 18 dargestellt.



**Abb. 18** Fluoreszenz-Chromatogramm mit Signalen aller eingesetzten Referenzsubstanzen für die DNA-Addukt-messung

Bei der Messung der neutral thermisch-hydrolysierten Proben zeigte sich, dass dort bereits nicht unerhebliche Mengen Guanin und Adenin freigesetzt wurden. Außer in der Kontrolle konnte N<sup>7</sup>-MG in allen Proben in geringen Mengen detektiert werden, jedoch kein weiteres der überprüften Addukte. Die saure thermische Hydrolyse lieferte wie erwartet große Mengen an Guanin und Adenin. O<sup>6</sup>-MG oder andere Addukte wurden jedoch nicht gefunden. Die gefunden Konzentrationen nach den beiden durchgeführten Hydrolysen sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

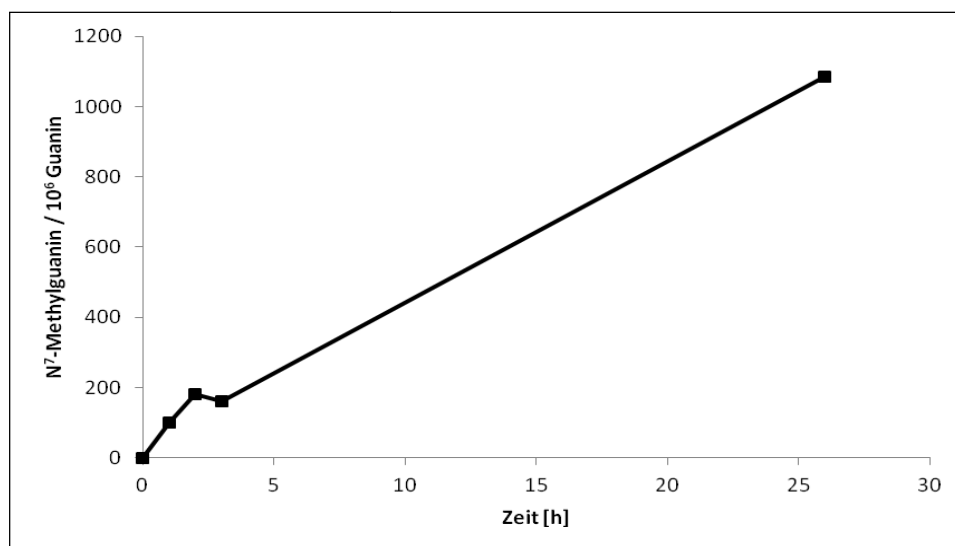
**Tab. 3.1 Konzentrationen der in den DNA-Hydrolysaten gemessenen DNA-Basen**

Probe	Neutral thermische Hydrolyse			Sauer thermische Hydrolyse			Quotient N <sup>7</sup> -Methylguanin / 10 <sup>6</sup> Guanin
	Guanin [ng/ml]	Adenin [ng/ml]	N <sup>7</sup> -Methylguanin [ng/ml]	Guanin [ng/ml]	Adenin [ng/ml]	O <sup>6</sup> -Methylguanin [ng/ml]	
Kontrolle	1193,9	1326,2	-	86936,6	93962,9	-	0
1h	1460,7	1380,4	8,70	79196,9	85639,8	-	100,5
2h	1731,7	1627,5	17,3	87944,8	97532,3	-	179,9
3h	1368,8	1242,2	20,2	114499,5	132014	-	161,4
4h	562,3	443,7	7,10	-			-
20h	1661,9	1207,2	88,0	-			-
26h	1179,5	849,3	84,9	71635,1	80568,2	-	1084,0

Aus den Konzentrationen des gefundenen N<sup>7</sup>-MG und der Guaninkonzentration nach saurer thermischer Hydrolyse wurde der Quotient gebildet. Um diese Messwerte vergleichen und die Wirkung von TriN2755 beurteilen zu können, wurden die N<sup>7</sup>-Methylguaninbasen auf 1 Million Guaninbasen bezogen (s. Tab 3.1). Dazu wurden in die Rechnung die Molekulargewichte der beiden Substanzen einbezogen. Für Guanin und N<sup>7</sup>-MG wurde dabei mit einem Molekulargewicht von 151,1g/mol bzw. 165,2g/mol gerechnet.

$$Quotient \left( \frac{N^7MG}{10^6 \times G} \right) = \frac{c(N^7MG)}{165,2 \text{ g/mol}} \times \frac{151,1 \text{ g/mol}}{c(G)} \times 10^{-6}$$

Die errechneten Werte wurden gegen den jeweiligen Messzeitpunkt aufgetragen (s. Abb. 19). Es zeigte sich, dass mit zunehmender Inkubationszeit mit TriN2755 der Anteil an N<sup>7</sup>-methyliertem Guanin zunahm und nach 26 Stunden ca. 1‰ erreichte.

**Abb. 19 Quotient aus N<sup>7</sup>-MG und Guanin in Abhängigkeit von der Inkubationszeit**

### 3.1.2 Photometrische Messung des DNA-Gehaltes

Der DNA-Gehalt wurde 4h und 26h nach Start der Inkubation gemessen. Die Absorption der Einzelstränge bei 260nm wurde von der Software automatisch in die DNA-Konzentration der

Probe umgerechnet. Für die Proben ergaben sich Konzentrationen von 30,032µg/ml bzw. 45,587µg/ml.

### 3.1.3 Photometrische Bestimmung der Metabolit-Konzentrationen

Die aus der Inkubation der Leukoyzten mit TriN2755 erhaltenen Überstände wurden vor der Aufarbeitung 1:5 mit Wasser verdünnt. Statt 3ml wurden davon jedoch nur 500µl für die Aufarbeitung verwendet. Insgesamt wurden dadurch die vorliegenden Konzentrationen um den Faktor 30 reduziert. Ausgehend von den ursprünglich eingesetzten 50µg/ml TriN2755 konnten daher maximal nur noch etwa 1,67µg/ml gefunden werden. Als Kontrolle wurde zusätzlich der Überstand von nicht inkubierten Zellen sowie eine entsprechend verdünnte, wässrige TriN2755-Lösung verwendet, die ebenfalls nach 26 Stunden aufgearbeitet und gemessen wurden.

**Tab. 3.2 Konzentrationen im Zellüberstand nach Inkubation mit TriN2755**

Probe	Imp1 [ng/ml]	Imp2 [ng/ml]	Imp3 [ng/ml]	Imp4 [ng/ml]	Imp7 [ng/ml]	Imp8 [ng/ml]	Imp10 [ng/ml]	Comp4 [ng/ml]	Comp5 [ng/ml]	TriN2755 [ng/ml]	TriN2758 [ng/ml]
TriN2755 Kontrolle	0,000	15,538	17,224	0,000	0,000	8,986	0,000	0,000	0,000	1440,200	0,000
Zellkontrolle	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1h	0,505	10,632	3,449	1,782	1,495	0,331	0,000	2,177	39,190	1612,490	0,000
2h	0,000	11,938	3,952	2,091	3,918	0,484	0,000	4,075	68,929	1579,811	0,000
3h	0,000	12,263	4,379	2,447	8,055	0,854	0,000	5,798	92,133	1492,242	0,000
4h	0,000	6,875	4,284	2,816	12,415	1,129	0,000	6,336	108,040	1398,263	0,000
20h	0,000	5,682	7,706	6,973	89,462	4,843	0,000	5,507	298,833	714,021	0,000
26h	0,287	4,233	7,950	7,659	102,420	5,897	0,000	6,039	351,803	594,360	0,000

Mit zunehmender Inkubationsdauer stiegen vor allem die Konzentrationen von Imp7 und Comp5, während die Konzentration von TriN2755 stetig abnahm (s. Tab. 3.2). Imp2 konnte ebenfalls bereits nach einer Stunde detektiert werden. Nach einem weiteren geringen Anstieg fiel die Konzentration jedoch wieder um etwa die Hälfte ab, was zum Teil auch der, im Rahmen der Validierung gefundenen Degradation (s. Kap. 3.2.6.1), geschuldet sein konnte. Anhand der Messwerte wurde überprüft wie sich die Summe der gemessenen Konzentrationen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit verhielt. Aus den summierten Werten und den theoretisch zu erreichenden 1,67µg/ml wurde die prozentuale Wiederfindung berechnet. Diese bezog sich jedoch nicht allein auf die Detektion von TriN2755, sondern auf die Summe der Konzentrationen von TriN2755 und seinen Metaboliten in der Lösung. Wie aus Tabelle 3.3 hervorgeht, sank die Summe der gefundenen Konzentrationen zum Ende der Inkubation um etwa ein Drittel, bezogen auf den Erwartungswert.

**Tab. 3.3 Abnahme der prozentualen Wiederfindung im Laufe der Inkubation**

Probe	Summe [ng/ml]	Wiederfindung [%]
TriN755 Kontrolle	1481,948	88,9
Zellkontrolle	0,000	0,0
1h	1672,051	100,3
2h	1675,198	100,5
3h	1618,171	97,1
4h	1540,158	92,4
20h	1133,027	68,0
26h	1080,648	64,8

## 3.2 Validierung

### 3.2.1 Linearität

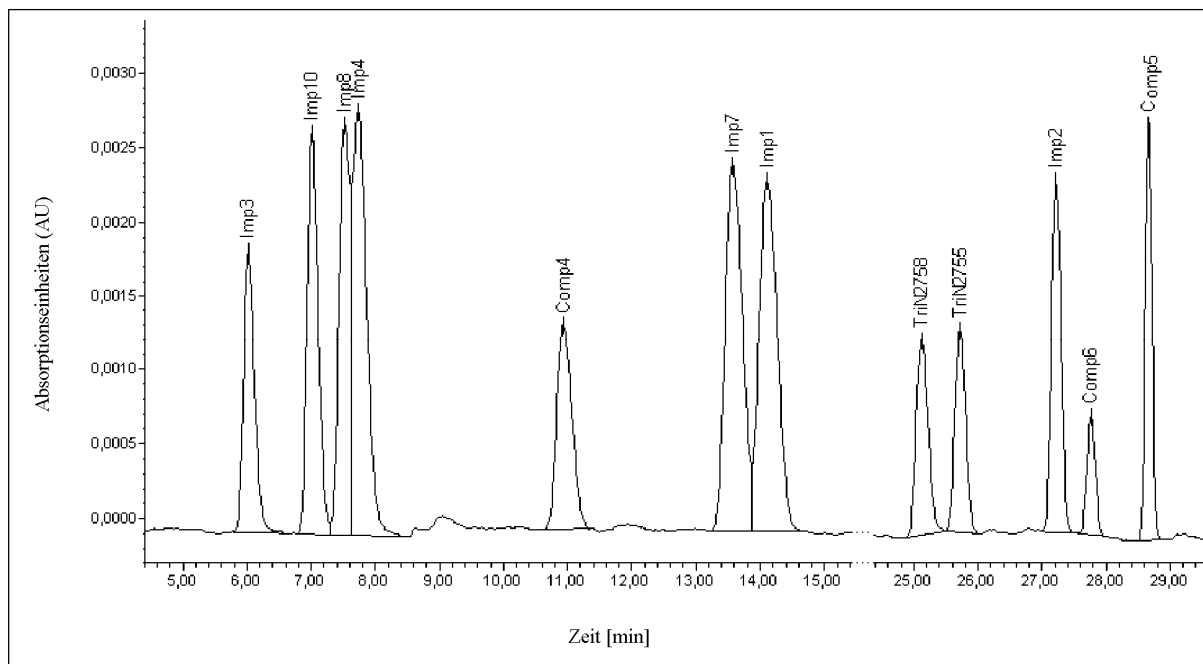
#### 3.2.1.1 Kalibriergeraden für die photometrische Detektion

Da die Kalibrierstandards jeweils alle 10 zu validierenden Analyten und TriN2758 enthielten, wurden diese im Folgenden als „Mix“ bezeichnet. Nach der Messung wurde mittels Empower2 aus den bei 300nm detektierten Signalen (s. Abb. 20) eine Kalibriergerade für jede der Substanzen erstellt. Die dabei erhaltenen Werte sind zusammen mit der jeweils eingesetzten Soll-Konzentration in Tabelle 3.4 dargestellt.

**Tab. 3.4 Durch lineare Regression errechnete Konzentrationen der Kalibrierstandards nach photometrischer Detektion**

Probe	Soll [ng/ml]	Imp1 [ng/ml]	Imp2 [ng/ml]	Imp3 [ng/ml]	Imp4 [ng/ml]	Imp7 [ng/ml]	Imp8 [ng/ml]	Imp10 [ng/ml]	Comp4 [ng/ml]	Comp5 [ng/ml]	TriN2755 [ng/ml]	TriN2758 [ng/ml]
Mix1	1,95	2,0	-	-	-	1,9	-	2,0	-	1,9	1,9	1,9
Mix2	3,90	3,9	3,8	-	-	4,0	-	3,8	3,8	3,9	4,0	4,1
Mix3	7,81	7,9	7,9	-	-	8,1	-	7,7	8,1	5,5	8,4	8,2
Mix4	15,9	13,3	16,3	15,0	-	16,0	-	16,5	16,7	15,6	16,1	16,1
Mix5	31,3	31,1	31,5	33,6	31,1	31,5	30,6	29,1	30,9	31,6	31,3	31,1
Mix6	62,5	64,1	64,1	69,1	63,8	64,9	65,7	65,7	65,1	65,6	63,8	64,3
Mix7	125	122,8	123,9	123,4	125,3	124,7	123,5	128,0	129,7	126,5	123,6	123,8
Mix8	250	238,1	238,5	239,3	239,4	235,6	240,9	247,4	241,9	225,9	235,4	236,5
Mix9	500	500,27	496,94	499,13	496,04	490,59	513,89	515,7	497,68	492,81	488,61	493,04
Mix10	1000	1019,2	1004,7	936,6	1033,1	982,84	988,64	962,47	918,78	988,96	985,51	983,27

Für alle Analyten zeigte sich über den gesamten Messbereich ein linearer Verlauf für den sich im Mittel ein Bestimmtheitsmaß von  $r^2 \geq 0,99$  ergab.

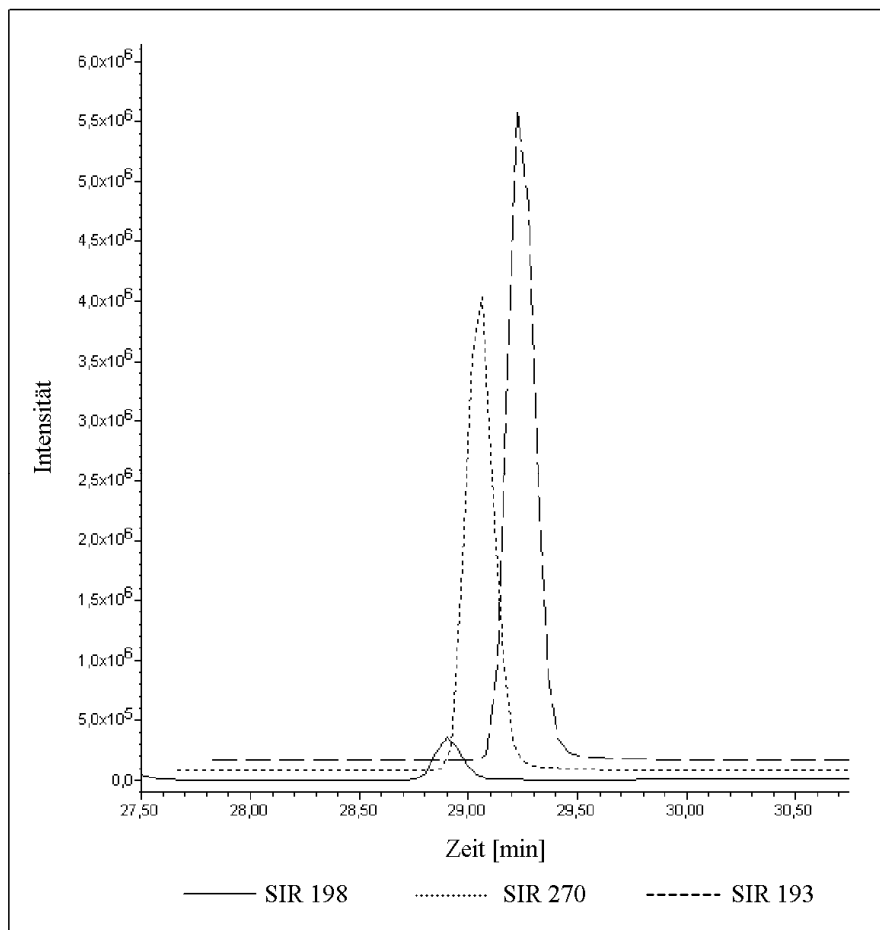


**Abb. 20 Ausschnitte aus dem PDA-Chromatogramm einer wässrigen Probe mit 50ng/ml jeder Referenzsubstanz inklusive dem nicht validierten Comp6**

### 3.2.1.2 Kalibriergeraden für die massensensitive Detektion

Wie zuvor erwähnt, konnten einige der Analyten in mindestens zwei Einzelionendetektionen gemessen werden (s. Kap. 2.3.8). Für die Validierung wurden bei diesen Substanzen aber jeweils nur die Massenspektren ausgewertet, die im direkten Vergleich die größte Sensitivität zeigten. Abbildung 21 zeigt beispielhaft die Signalstärke bei der Bestimmung von Comp5 mit den drei Massen-zu-Ladungsverhältnissen  $m/z = 193$ ,  $198$  und  $270$ .





**Abb. 21 Vergleich der für Comp5 erhaltenen Signale im MS**

Bei der späteren Analyse der Patientenproben wurden jedoch die Messwerte aller Einzelionendetektionen herangezogen, um die Ergebnisse des validierten Massen-zu-Ladungsverhältnisses zu stützen. Für die Analyten Imp1, Imp2, Comp5 und TriN2755 musste eine quadratische Anpassung gewählt werden. Für alle anderen Analyten erfolgte eine lineare Anpassung. Mit der gewählten Wichtung von  $1/x^2$  konnte so über den gesamten validierten Messbereich für alle Analyten ein Bestimmtheitsmaß  $r^2 \geq 0,98$  erreicht werden. In Tabelle 3.5 sind die im Rahmen der linearen bzw. quadratischen Regression von Empower2 berechneten Konzentrationen zusammen mit den erwarteten Soll-Werten aufgeführt.

**Tab. 3.5 Durch lineare Regression errechnete Konzentrationen der Kalibrierstandards nach massenspektrometrischer Detektion**

Probe	Soll [ng/ml]	Imp1 [ng/ml]	Imp2 [ng/ml]	Imp3 [ng/ml]	Imp4 [ng/ml]	Imp7 [ng/ml]	Imp8 [ng/ml]	Imp10 [ng/ml]	Comp4 [ng/ml]	Comp5 [ng/ml]	TriN2755 [ng/ml]	TriN2758 [ng/ml]
SIR	m/z	193	198	214	215	193	256	214	193	193	198	198
Mix1	0,50	-	0,5	-	-	-	0,4	-	-	0,5	-	-
Mix2	1,00	-	1,0	1,1	-	-	1,3	-	1,8	0,8	1,1	1,1
Mix3	2,00	2,0	1,8	1,8	5,2	2,1	2,1	2,1	2,7	2,0	1,6	1,8
Mix4	3,00	2,3	2,9	2,4	2,4	2,7	2,5	2,5	2,7	3,0	2,9	2,6
Mix5	4,00	4,2	4,0	3,7	4,3	4,1	4,3	3,8	4,1	4,4	3,9	3,6
Mix6	5,00	5,3	5,5	4,9	5,2	5,0	5,1	5,7	4,9	5,3	5,8	5,7
Mix7	10,0	9,7	9,2	7,7	9,2	9,2	9,7	9,7	9,5	8,6	9,2	8,3
Mix8	20,0	21,2	20,9	23,3	23,6	22,5	23,2	22,3	22,7	22,8	20,9	22,0
Mix9	50,0	48,53	52,33	50,09	50,13	50,33	47,86	56,83	49,49	48	49,98	50,71
Mix10	100	94,13	102,57	109,97	105,92	105,81	102,21	94,33	102,81	97,09	100,49	102,61
Mix11	200	198,34	197,32	220,34	200,97	203,47	191,67	202,25	205,27	211,05	215,12	216,71
Mix12	500	514,87	497,85	501,98	420,29	443,3	409,46	411,94	497,81	490,76	484,31	511,98

### 3.2.2 Richtigkeit

#### 3.2.2.1 Richtigkeit der MS-Detektion

Die Messung der Proben fand unterschiedlich oft statt. Es wurden aber für die Bewertung immer mindestens Doppelbestimmungen vorgenommen. Bei der höchsten Konzentration von 400ng/ml und bei niedrigen Konzentrationen im einstelligen ng/ml-Bereich wurde öfter gemessen, um in diesen Grenzbereichen verlässlichere Ergebnisse zu erhalten. Aufgrund eines Pipettierfehlers lag die Konzentration von Imp8 bei 300ng/ml, so dass die Mehrfachbestimmung für diese Konzentration durchgeführt wurde. Signale bei Probenkonzentrationen von unter 1ng/ml waren größtenteils nicht mehr quantifizierbar und wurden hier nicht aufgelistet. Sie wurden aber dennoch für die Bestimmung der Detektionsgrenze benötigt (s. Kap. 3.2.4). Wie sich klar erkennen ließ, war die Detektion von Imp10 mittels MS im gesamten überprüften Konzentrationsbereich nicht zuverlässig. Da die Richtigkeit der Messung innerhalb der Grenzen von 15% bzw. 20% Grundvoraussetzung für eine valide Methode war, galt Imp10 bereits ab diesem Zeitpunkt für die MS-Detektion als nicht validierbar. Alle anderen Substanzen konnten jedoch bei einer Konzentration von 3ng/ml mit einem relativen Fehler von maximal 9,5% richtig detektiert werden (s. Tab. 3.6).

**Tab. 3.6 Ergebnis der Bestimmung der Richtigkeit nach MS-Detektion**

Konz. [ng/ml]	Anzahl Messungen	f <sub>Imp1</sub> [%]	f <sub>Imp2</sub> [%]	f <sub>Imp3</sub> [%]	f <sub>Imp4</sub> [%]	f <sub>Imp7</sub> [%]	f <sub>Imp10</sub> [%]	f <sub>Comp4</sub> [%]	f <sub>Comp5</sub> [%]	f <sub>TriN2755</sub> [%]	f <sub>TriN2758</sub> [%]	Konz. [ng/ml]	Anzahl Messungen	f <sub>Imp8</sub> [%]
1,00	3	40,0	4,7	-16,1	-	-5,8	517,5	12,6	-6,5	30,8	-10,8	1,00	3	-2,3
1,50	3	1,4	-2,4	-0,7	-	3,4	44,1	-7,4	-3,1	1,4	-5,9	1,50	3	-22,1
3,00	5	-4,2	-3,7	-2,6	1,1	-1,9	104,9	1,8	0,7	3,9	-9,5	3,00	5	-3,0
5,00	2	1,8	7,4	-8,4	-0,2	-6,7	317,6	-9,7	-17,3	-2,2	-11,2	3,75	4	-11,2
7,50	2	-2,0	-4,3	-2,8	-9,2	-4,2	46,1	-1,2	-1,8	-3,4	-10,7	6,00	2	7,1
20,0	2	-8,6	11,5	9,1	8,7	8,2	251,7	2,6	-10,5	6,1	4,4	7,50	2	-2,1
50,0	3	-14,7	4,4	2,4	-2,0	-1,3	97,8	-1,2	-2,4	1,7	1,3	17,5	4	1,5
75,0	2	-9,2	-2,3	1,5	0,5	0,3	76,4	-0,2	-12,5	-7,6	-4,3	37,5	3	-3,9
150	2	-5,5	3,6	7,9	-2,3	-1,0	9,1	3,3	-0,6	-3,8	0,1	50,0	2	2,2
200	2	-4,3	1,2	0,8	-0,2	-0,9	94,9	-0,3	-8,2	1,0	0,6	150	5	-4,7
400	7	6,2	-7,1	-4,5	-5,9	-7,9	59,0	-1,7	-5,2	-2,0	-0,5	300	9	-5,9

### 3.2.2.2 Richtigkeit der PDA-Detektion

Bei der photometrischen Detektion konnte keine klare untere Grenze für eine zuverlässige Messung festgestellt werden. Während die beiden TriN-Verbindungen, Comp5 und Imp1 bereits ab 1,95ng/ml mit einem relativen Fehler von unter 15% zu detektieren waren und Imp4 mit einem relativen Fehler von 17,1%, war dies bei Comp4 und Imp10 erst ab 15,6ng/ml möglich. Im Gegensatz zur MS-Detektion konnte Imp10 ab dieser Konzentration ebenfalls zuverlässig quantifiziert werden. Der Fehler für Imp3 lag selbst bei 15,6ng/ml noch oberhalb der vorgegebenen Grenzen. Imp2 und Imp7 dagegen ließen sich ab 3,90ng/ml richtig detektieren und Imp8 ab 7,81ng/ml. In Tabelle 3.7 sind die mittleren relativen Fehler zusammengestellt.

**Tab. 3.7 Ergebnis der Bestimmung der Richtigkeit nach PDA-Detektion**

Konz. [ng/ml]	Anzahl Messungen	f <sub>Imp1</sub> [%]	f <sub>Imp2</sub> [%]	f <sub>Imp3</sub> [%]	f <sub>Imp4</sub> [%]	f <sub>Imp7</sub> [%]	f <sub>Imp8</sub> [%]	f <sub>Imp10</sub> [%]	f <sub>Comp4</sub> [%]	f <sub>Comp5</sub> [%]	f <sub>TriN2755</sub> [%]	f <sub>TriN2758</sub> [%]
1,95	2	-5,3	-37,3	-	-17,1	-23,4	169,0	-23,8	30,0	-14,1	0,4	-5,5
3,90	2	-2,1	-0,6	-41,5	-4,1	-5,4	92,2	-13,9	-3,4	-3,4	7,9	3,2
7,81	2	-3,8	-12,7	-91,5	1,4	-1,5	-7,9	-25,6	-19,8	-13,8	-1,5	3,2
15,6	2	1,0	3,5	-36,6	6,8	0,8	-2,7	0,7	2,1	-1,3	2,5	1,0
62,5	2	0,0	0,9	-0,2	-1,0	1,8	4,3	1,7	2,2	2,7	0,2	0,3
125	2	0,8	-2,7	-0,5	-5,4	-2,3	0,0	-1,2	-2,0	-1,8	-3,3	-3,1
250	2	-3,2	-4,9	-3,8	-5,5	-5,3	-3,1	-2,8	-3,3	-9,3	-6,3	-5,7
500	8	-5,2	-5,6	-5,8	3,0	-11,6	-7,8	-5,4	-4,4	-10,5	-8,5	-9,5

Wie erwartet konnten mit dem PDA jedoch auch sehr viel höhere Konzentrationen als 500ng/ml mit einem maximalen relativen Fehler von 5,6% richtig detektiert werden, wie die Auswertung der dafür hergestellten Lösung zeigte (s. Tab 3.8).

**Tab. 3.8 Richtigkeit und Präzision von ULQ-Proben**

Referenzsubstanz	Soll [ng/ml]	Richtigkeit f [%]	Präzision V [%]
Imp1	5.000	2,0	0,3
Imp2	2.500	1,5	0,2
Imp3	20.000	4,0	0,6
Imp4	20.000	5,6	0,5
Imp7	2.500	3,0	0,5
Imp8	5.000	-1,5	2,5
Imp10	2.500	2,8	0,4
Comp4	5.000	2,9	0,4
Comp5	2.500	-0,4	0,4
TriN2755	100.000	2,3	0,4
TriN2758	2.500	3,0	0,2

### 3.2.3 Präzision

#### 3.2.3.1 Präzision der MS-Detektion

Nachdem jeweils sechs Lösungen gemessen worden waren, wurden die Signale ausgewertet und wie oben beschrieben die relative Standardabweichung berechnet. Über den gesamten Messbereich wurden die Grenzen von 15% bzw. 20% an der unteren Quantifizierungsgrenze (Mix A) nicht überschritten. Die Mittelwerte der errechneten relativen Standardabweichungen sind in Tabelle 3.9 zusammengestellt:

**Tab. 3.9 Ergebnis der Bestimmung der Präzision nach MS-Detektion**

	Mix	Imp1	Imp2	Imp3	Imp4	Imp7	Imp8	Imp10	Comp4	Comp5	TriN 2755	TriN 2758
Konzentration [ng/ml]	A	4,00	3,00	3,00	3,00	5,00	2,00	10,0	5,00	4,00	3,00	3,00
Variationskoeffizient [%]		5,2	3,2	9,1	6,1	8,6	16,7	4,7	7,2	10,4	8,2	5,3
Konzentration [ng/ml]	B	20,0	20,0	20,0	20,0	25,0	15,0	50,0	25,0	20,0	20,0	20,0
Variationskoeffizient [%]		2,0	4,2	2,5	2,5	3,5	5,1	2,0	4,3	3,1	3,6	3,0
Konzentration [ng/ml]	C	500	400	400	400	500	300	650	500	500	400	400
Variationskoeffizient [%]		6,8	5,1	4,8	4,7	5,2	5,7	5,0	4,6	7,5	6,5	6,0
Konzentration [ng/ml]	D	150	150	150	150	150	150	300	150	75,0	100	125,0
Variationskoeffizient [%]		10,8	4,9	8,2	10,0	8,0	7,1	5,8	8,5	8,6	5,6	5,6
Konzentration [ng/ml]	E	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	50,0	15,0	10,0	10,0	12,5
Variationskoeffizient [%]		10,1	14,1	6,1	7,0	4,8	3,7	14,1	7,9	9,6	6,9	9,7
Konzentration [ng/ml]	F	1000	75,0	650	750	650	500	1000	650	30,0	30,0	40,0
Variationskoeffizient [%]		2,6	1,5	1,7	1,5	2,7	1,4	3,3	1,9	4,8	14,3	2,8

### 3.2.3.2 Präzision der PDA-Detektion

Auch für den PDA konnte eine präzise Detektion für alle Referenzsubstanzen in allen getesteten Konzentrationen gezeigt werden. Lediglich Imp8 lag bei einer Konzentration von 7,5ng/ml mit einem Prozentpunkt über dem Grenzwert von 15%. Für die höher konzentrierte Lösung, die bereits im Hinblick auf die Richtigkeit ausgewertet wurde, lag die höchste relative Standardabweichung bei 2,5% für Imp8 (s. Tab. 3.8). Die Messergebnisse sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst.

**Tab. 3.10 Ergebnis der Bestimmung der Präzision nach PDA-Detektion**

	Mix	Imp1	Imp2	Imp3	Imp4	Imp7	Imp8	Imp10	Comp4	Comp5	TriN 2755	TriN 2758
Konzentration [ng/ml]	A	12,5	12,5	17,5	12,5	20,0	7,50	50,0	12,5	8,00	20,0	20,0
Variationskoeffizient [%]		2,8	3,5	1,9	7,1	2,4	16,0	2,4	2,1	2,4	10,1	2,5
Konzentration [ng/ml]	B	150,0	125,0	150,0	150,0	150,0	150,0	300,0	150,0	50,0	225,0	100,0
Variationskoeffizient [%]		5,2	4,9	5,5	5,6	5,0	5,2	5,2	6,1	5,4	4,9	4,9
Konzentration [ng/ml]	C	450	350	350	350	450	300	600	450	400	350	350
Variationskoeffizient [%]		6,3	6,0	6,1	6,2	6,8	7,6	6,0	6,9	9,1	6,3	6,4
Konzentration [ng/ml]	D	1000	70,0	650	650	600	500	1000	650	25,0	25,0	40,0
Variationskoeffizient [%]		3,1	3,7	1,6	2,4	2,5	1,7	2,6	2,4	4,1	3,5	2,8

Zur weiteren Absicherung wurde aus allen, durch PDA-Detektion erhaltenen, Werten neben der relativen Standardabweichung auch der relative Fehler berechnet, wie dies bereits bei der Überprüfung der Richtigkeit (s. Kap. 2.5.2) getan wurde (Daten nicht gezeigt). Hierbei

zeigten sich jedoch bei Mix A für Imp4, Imp8, Imp10 und TriN2758 deutlich höhere Werte als die zulässigen 20%. Für Imp3 und Comp4 wurde der Grenzwert mit 15,4% bzw. 22% sogar bei einer Konzentration von 150ng/ml überschritten, so dass diese Konzentration für Imp3 und Comp4 als nicht validiert galt, weil eine präzise Messung nicht sichergestellt werden konnte.

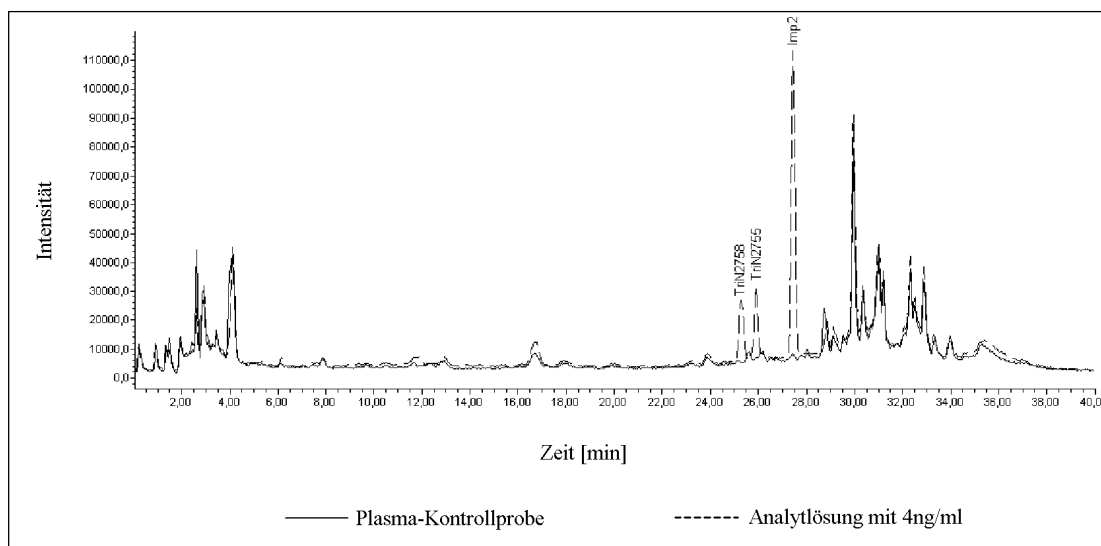
#### 3.2.4 Quantifizierungs- und Detektionsgrenze

Die im Rahmen der Validierung gemessenen Proben mit der niedrigsten Konzentration waren auf 0,375ng/ml verdünnt. Die Signale bei dieser Konzentration waren in allen MS-Spuren vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden. 0,375ng/ml waren damit die Detektionsgrenze für die Verwendung des MS. Aufgrund der bereits erwähnten geringeren Sensitivität des PDAs lag die Detektionsgrenze hier bei 1,95ng/ml.

Als untere Quantifizierungsgrenze wurden nur Messwerte akzeptiert, die bei der Bestimmung der Präzision und der Richtigkeit nicht mehr als 20% von ihrem Sollwert abwichen. Mit Ausnahme von Imp10, das mit einer relativen Abweichung von über 50% die gegebene Grenze klar überschritt, konnten unter Verwendung massenspektrometrischer Detektion 3ng/ml als LLQ identifiziert werden. Die für die Bestimmung der oberen Quantifizierungsgrenze des PDAs hergestellte Probe wurde sechs Mal gemessen und lieferte bei der Berechnung der relativen Abweichung 5,6% als höchsten Wert. (s. Tab. 3.8) Da eine Abweichung von bis zu 15% toleriert werden konnte und keine Proben mit höheren Konzentrationen im Verlauf der Validierung gemessen wurden, galten die jeweils gemessenen Konzentrationen als ULQ.

#### 3.2.5 Selektivität/Spezifität

Nach der Messung der hergestellten Lösungen sowie der analytfreien Kontrollproben, wurden die resultierenden Chromatogramme übereinandergelegt und die Basislinie der Kontrollprobe im Bereich der Retentionszeit der Analyten kontrolliert. Für die Bewertung des MS wurden die jeweils zusammengehörenden SIR-Chromatogramme verglichen (s. Abb. 22). Wurde ein potenzieller Störpeak entdeckt, konnten die Peaks mit Hilfe von Empower2 integriert und die Flächen miteinander verglichen werden. Dabei wurde in keinem der sechs SIRs ein Signal gefunden, dessen Fläche größer als 20% der entsprechenden LLQ-Konzentration war.



**Abb. 22 Vergleich der Basisline einer Kontrollprobe mit einer Analytlösung in Plasma bei SIR 198**

Von den vom PDA aufgezeichneten 3D-Chromatogrammen wurden, wie bereits beschrieben, nur die Chromatogramme mit einer Anregungswellenlänge von 300nm betrachtet. Hier zeigte sich jedoch im Gegensatz zum MS, dass die Signale von Imp3, Imp4, Imp8, Imp10 und Comp4 bei den getesteten 8ng/ml durch Matrixbestandteile überlagert wurden und daher in diesem Konzentrationsbereich nicht quantifiziert werden konnten.

### 3.2.6 Stabilität

Für die Wiederfindungsrate waren seitens der verwendeten Literatur keine Grenzen vorgegeben und auch das Erreichen von 100% für jeden Messwert war nicht gefordert. Wichtiger war es ein einheitliches Bild für alle Werte des überprüften Konzentrationsbereiches sowie den Verlauf der Wiederfindungsrate einer Substanz in Abhängigkeit von den Lagerbedingungen und der Lagerzeit zu finden. Da die getesteten Lösungen, wie auch später die Patientenproben, einen Mix aus mehreren bzw. allen Referenzsubstanzen darstellten, wurde sich bezüglich der Lagerbedingungen an der am wenigsten stabilen Substanz orientiert. Diese wurde anhand des Verlaufs der Wiederfindungsraten bestimmt. Zeigte dieser für einen Analyten einen starken Abfall so sprach dies für eine Degradation des Analyten unter den getesteten Lagerbedingungen. Folglich durfte dann unter diesen Bedingungen keine der Proben gelagert werden.

#### 3.2.6.1 Stabilität in Plasma bei unterschiedlichen Lagerbedingungen

Die Lagerung in Plasma bei Raumtemperatur führte zu einer derart starken Degradation von Imp2 und Imp10, welches wie weiter oben beschrieben ohnehin nicht sicher gemessen werden konnte, dass selbst bei der höchsten Konzentration nur eine Wiederfindungsrate von unter 5% erzielt wurde. Auch bei einer Lagertemperatur von 4°C waren Imp2 und Imp10 vor

allem in den niedrigeren Konzentrationen nicht stabil, so dass maximal nur noch 55% gefunden werden konnten. Die Lagerung bei -20°C und -80°C zeigte für Imp2, Imp10 und alle anderen Substanzen bei den drei getesteten Konzentrationen jedoch ein einheitliches Bild ohne relevante Veränderungen der Wiederfindungsraten.

Die Analyten in der Lösung mit den höchsten Konzentrationen, deren Stabilität nur mittels der PDA Messwerte überprüft wurde, zeigten bei der Lagerung über 28 Tage bei Raumtemperatur Konzentrationsabnahmen im Bereich von 14% - 29%. Auch die Lagerung bei 4°C und -20°C führte nach 28 Tagen zur Abnahme der Analytkonzentrationen um bis zu 19%. Am stabilsten waren die Proben bei -80°C, da sich hier, bis auf Imp4 mit einer Abnahme von ca. 16%, die Konzentrationen sonst nur um maximal 12% verringerten.

#### 3.2.6.2 Stabilität vorbereiteter Proben bei unterschiedlichen Lagerbedingungen

Bei der Lagerung bereits aufgearbeiteter Proben waren Imp2 und Imp10 selbst nach 15 Tagen bei Raumtemperatur noch mit einer durchschnittlichen Wiederfindungsrate von 99% zu quantifizieren. Auch durch Kühlen bzw. Einfrieren konnten keine besseren Werte erzielt werden. Anhand der Wiederfindungsraten war damit klar zu erkennen, dass die Analyten in einer für die Messung vorbereiteten Probe sehr viel stabiler waren als die in Plasma aufbewahrten Substanzen. Proben, die nicht direkt nach der Aufarbeitung gemessen wurden, wurden dennoch bei -20°C gelagert, um einheitliche Lagerbedingungen für alle Proben zu schaffen.

#### 3.2.6.3 Stabilität in Plasma nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen

Es konnte gezeigt werden, dass das viermalige Einfrieren und Auftauen des Plasmas nur einen sehr geringen Einfluss auf die Spiegel der Analyten hatte. Bei keiner der eingesetzten Substanzen führte es zu einer vermehrten Degradierung. Dies konnte für 50ng/ml mittels MS und für 500ng/ml mit beiden Detektoren gezeigt werden. Wie auch schon bei den Versuchen zur Richtigkeit und Präzision war eine genaue Bestimmung von Imp10 mittels MS jedoch nicht möglich.

### 3.3 Konzentrationsbestimmung von TriN2755 und seinen Metaboliten

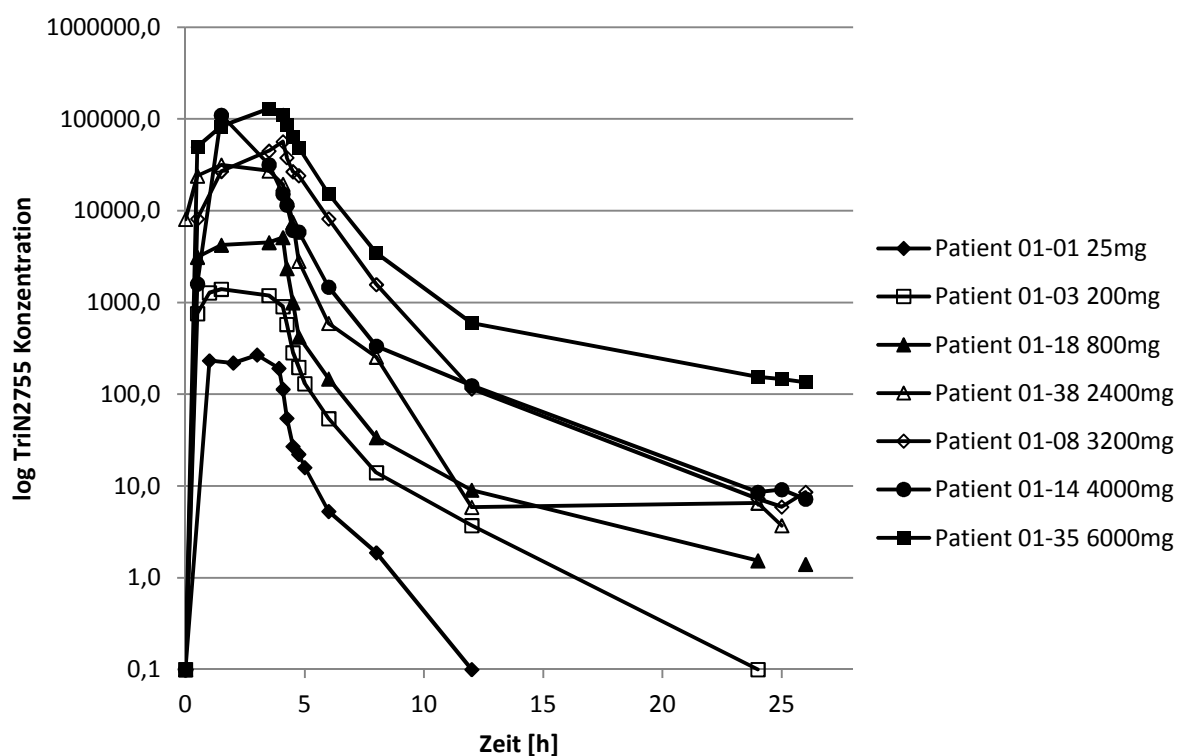
#### 3.3.1 Quantifizierung im Plasma

Insgesamt wurden von den 38 behandelten Patienten 514 Plasmaproben gesammelt. Alle Proben wurden wie beschrieben aufgearbeitet, mit dem zuvor validierten System gemessen und anschließend mit Empower2 ausgewertet. Im Laufe der Studie identifizierte Metaboliten konnten lediglich qualitativ erfasst werden, da für diese Metaboliten keine Standards zur

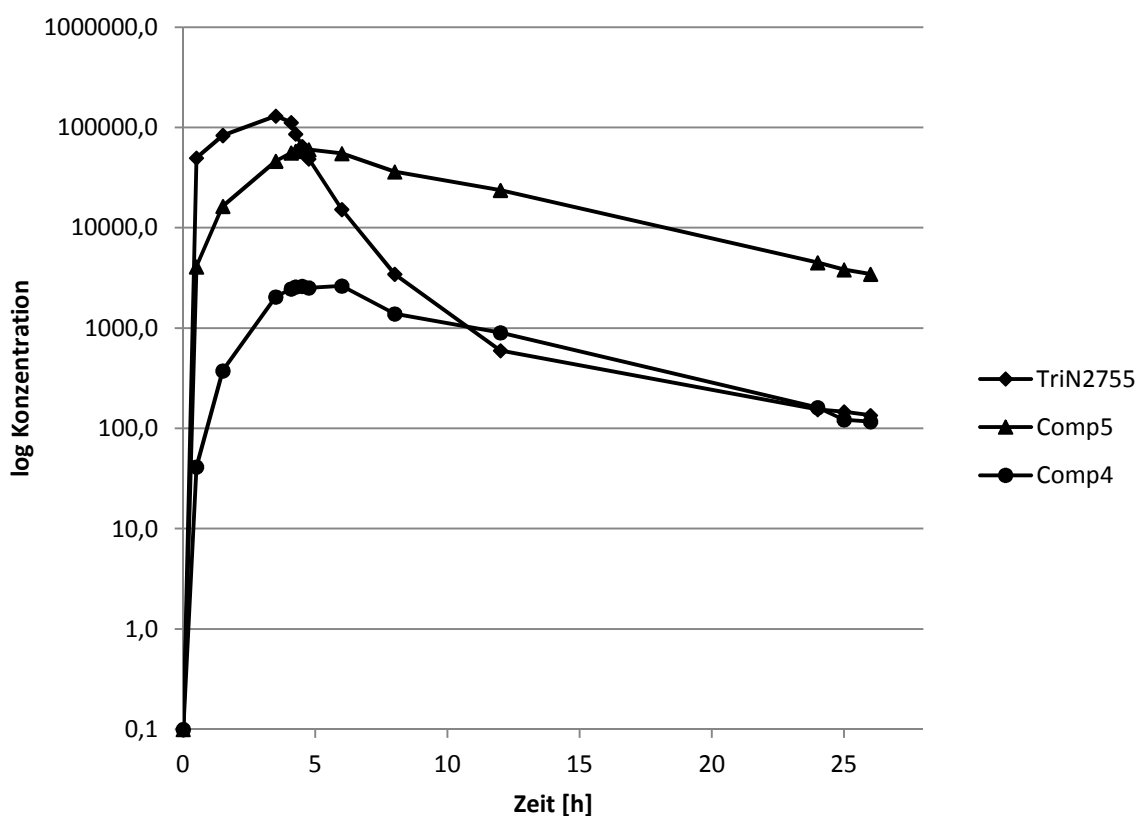


Erstellung einer Kalibriergeraden zur Verfügung standen. Zudem nahmen Koelution und Tailing-Effekte mit steigender TriN2755-Dosis weiter zu. Die mit diesem Messsystem erhaltenen Peakflächen schienen daher zur Verfolgung der Plasmaspiegel nicht geeignet zu sein.

Es zeigte sich sehr schnell, dass die Plasmaspiegel von TriN2755, Comp5 sowie Comp4 weit höher lagen, als die aller anderen quantifizierbaren Metaboliten. Es konnte jedoch in keiner der gemessenen Proben Imp4 und das daraus resultierende Imp1 detektiert werden. In Abbildung 23 wurden Konzentrations-Zeit-Kurven von TriN2755 für sieben der fünfzehn untersuchten Dosisstufen dargestellt, während in Abbildung 24 der Verlauf von TriN2755 zusammen mit seinen Hauptmetaboliten nach der Verabreichung der höchsten überprüften Dosis von 6000mg exemplarisch dargestellt wurde. Die Messdaten wurden im Anhang in den Tabellen 9.1 - 9.3 zusammengefasst.



**Abb. 23 Konzentrations-Zeit-Kurven mehrerer Patienten in unterschiedlichen Dosisstufen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die y-Achse logarithmiert**



**Abb. 24 Konzentrations-Zeit-Kurven von TriN2755 und seinen Hauptmetaboliten nach der Gabe von 6000mg TriN2755 an Patient 01-35; logarithmierte Darstellung**

### 3.3.2 Quantifizierung im Urin

Wie die Plasmaproben wurden auch die Urine nach dem Wiegen und Einstellen des pH-Wertes aufgearbeitet und gemessen. Da für die Anzahl der Urinproben keine Vorgabe existierte, wurden alle Proben, die innerhalb des 24 bzw. 26 Stunden Zeitfensters abgegeben wurden, mit einbezogen. Die von den Patienten abgegebenen Urinproben reichten daher von drei bis fünfzehn Stück. Von allen Patienten wurden so insgesamt 352 Urinproben erhalten, die in einigen Fällen jedoch nicht auswertbar waren. In Tabelle 9.4 im Anhang wurden die in den einzelnen Urinproben gemessenen TriN2755-Konzentrationen zusammengestellt. Die Methode wurde jedoch nur für die Aufarbeitung und Messung von Plasmaproben validiert, so dass in Hinblick auf die Robustheit und Reproduzierbarkeit bezüglich Urin als Probenmatrix keine Aussage getroffen werden konnte. Dementsprechend waren auch die im Anschluss für TriN2755 berechnete renale Clearance sowie die aufsummierte prozentuale Ausscheidung mit einer gewissen Unsicherheit belegt.

### 3.4 Pharmakokinetische Auswertung

#### 3.4.1 Lineare und nicht-lineare Pharmakokinetik

Seit Beginn der Studie wurden AUC und  $C_{\max}$  von TriN2755, Comp5 und Comp4 direkt in Beziehung zur verabreichten Dosis betrachtet, um so deren Verhalten bei steigender Dosis beurteilen zu können. Im Idealfall der linearen Pharmakokinetik hätte die Verdopplung der Dosis ebenfalls zu einer Verdopplung der AUC sowie der gemessenen Plasmaspiegel geführt. Für die Patienten #01-01 bis #01-07 in den Dosisstufen von 25mg - 1600mg TriN2755 ergaben sich nahezu lineare Zusammenhänge sowohl zwischen der AUC und der verabreichten Dosis, als auch zwischen der  $C_{\max}$  von Comp5 bzw. Comp4 und der verabreichten Dosis wie in den Abbildungen 25 und 26 dargestellt. Lediglich für die  $C_{\max}$  von TriN2755 wurde ein geringere Korrelationsfaktor gefunden. Alle ermittelten pharmakokinetischen Parameter befinden sich im Anhang in den Tabellen 9.5 - 9.7.

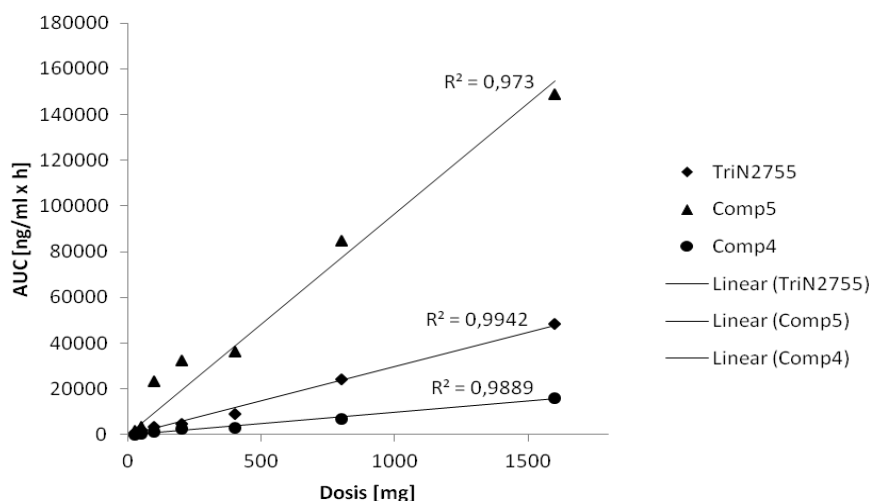


Abb. 25 AUCs der Patienten #01-01 bis #01-07 aufgetragen gegen die verabreichte Dosis

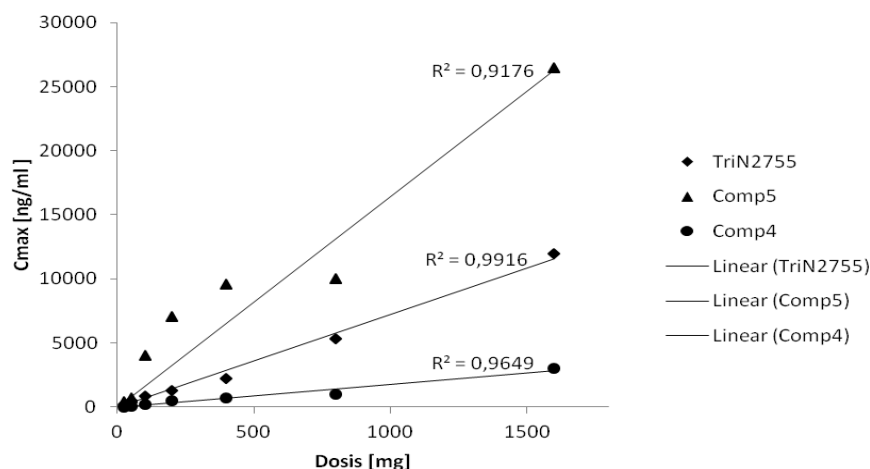


Abb. 26  $C_{\max}$ -Werte der Patienten #01-01 bis #01-07 aufgetragen gegen die verabreichte Dosis

Nach der Verabreichung von 3200mg TriN2755 an die folgenden drei Patienten deutete sich jedoch bereits ein überproportionaler Anstieg der beiden Parameter für alle drei überprüften Substanzen an. Aber auch die Ergebnisse der ersten Patienten des erst später geöffneten Arm B, die eine Dosis von 800mg bzw. 1200mg erhielten, fügten sich nicht in den oben gezeigten, annähernd linearen Zusammenhang ein. Da für beide Behandlungsarme die Kinetik nur am ersten Tag des ersten Zyklus durchgeführt wurde, wurden die Ergebnisse aus Arm A und Arm B zusammengefasst und die arithmetischen Mittelwerte von  $C_{\max}$  und AUC gegen die entsprechend verabreichte Dosis aufgetragen. Dabei zeigten sich für potenzielle Trendlinien die besten Korrelationsfaktoren.

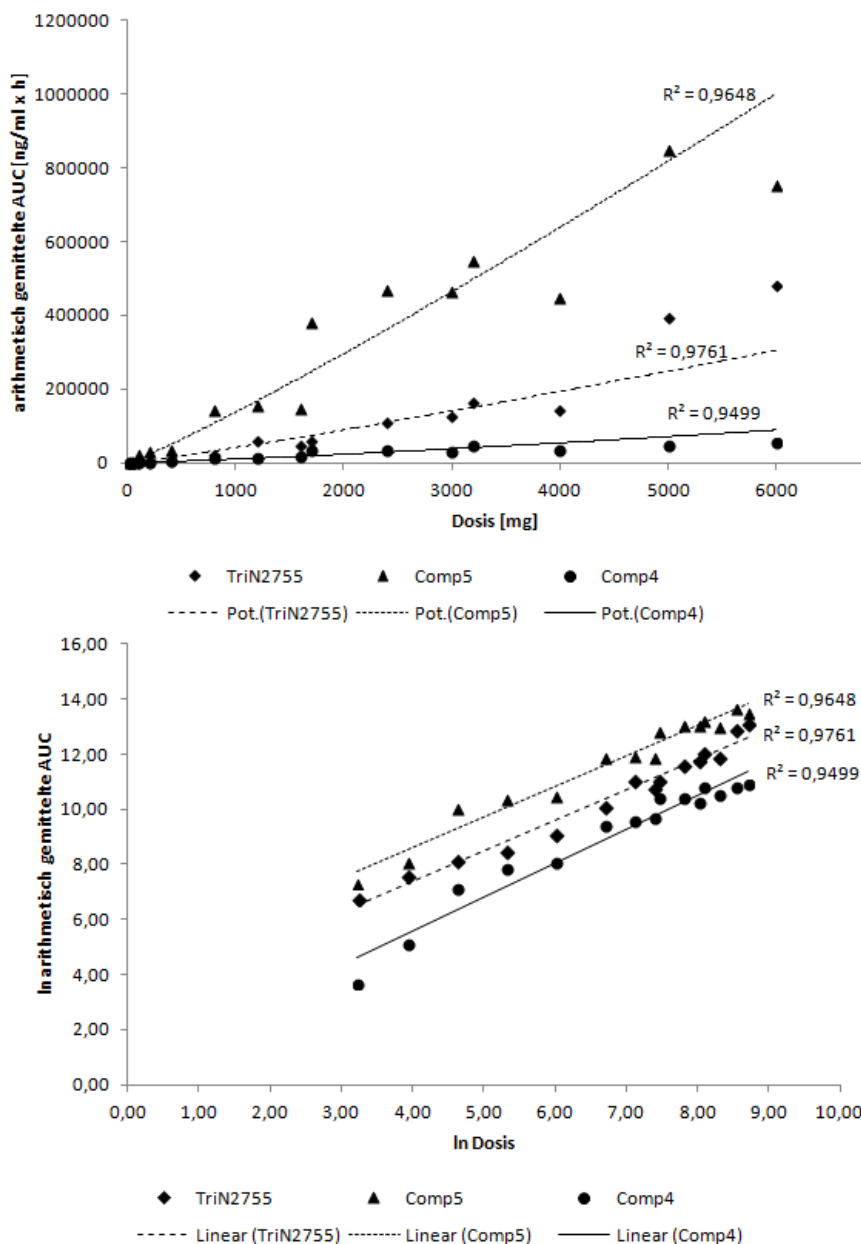


Abb. 27 Oben: Gemittelte AUC aufgetragen gegen die verabreichte Dosis mit potenziellen Ausgleichsgeraden. Unten: Linearisierte Darstellung durch doppeltlogarithmische Auftragung

Um zu überprüfen, ob wirklich ein potentieller Zusammenhang vorlag, wurde versucht die Kurven zu linearisieren indem aus x- und y-Werten jeweils der natürliche Logarithmus gebildet wurde. Die linearisierten Kurven für die AUC und  $C_{\max}$  wurden in den Abbildungen 27 und 28 dargestellt. Da dies gelang, konnte gezeigt werden, dass bei dieser Applikationsart und mehr als 800mg TriN2755 ein Wechsel von der linearen Kinetik hin zu nicht-linearer Kinetik stattfand.

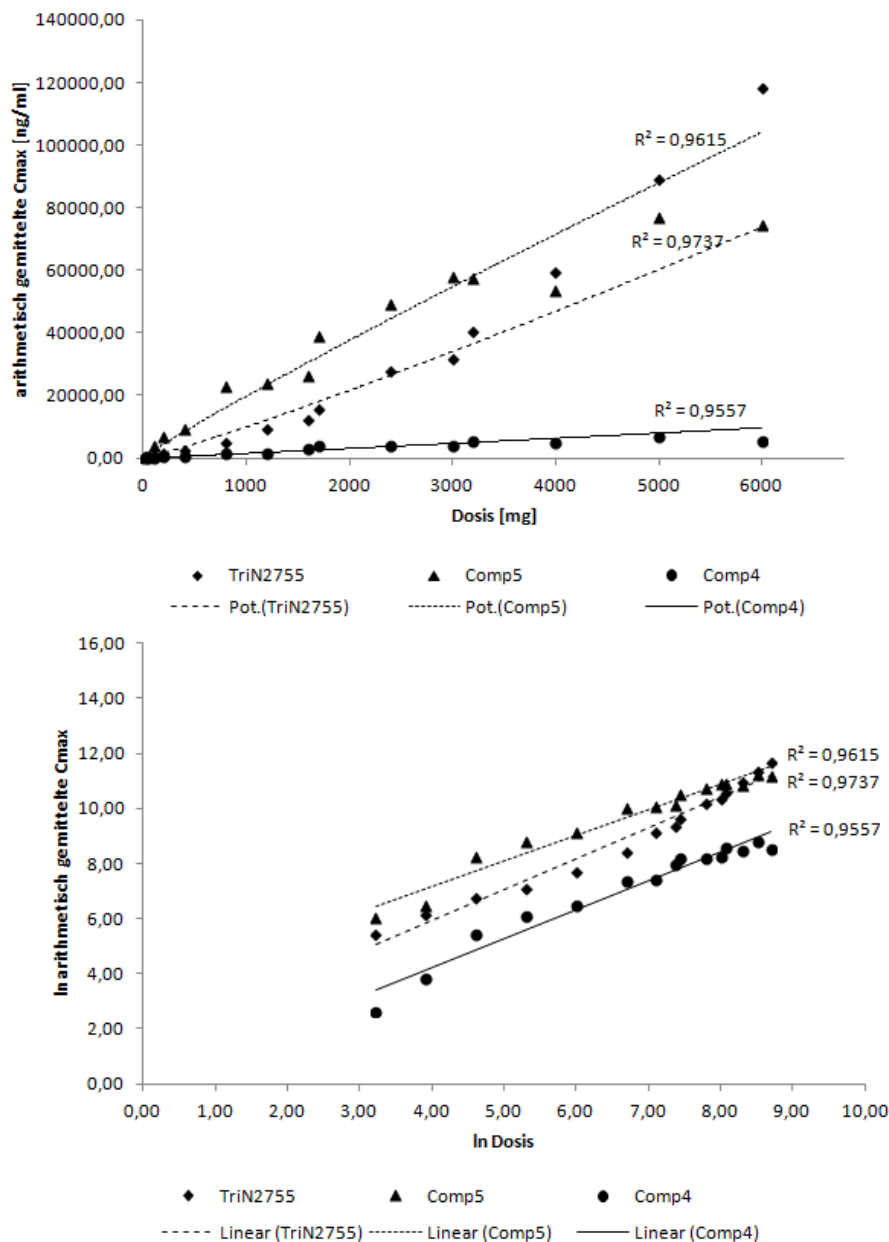
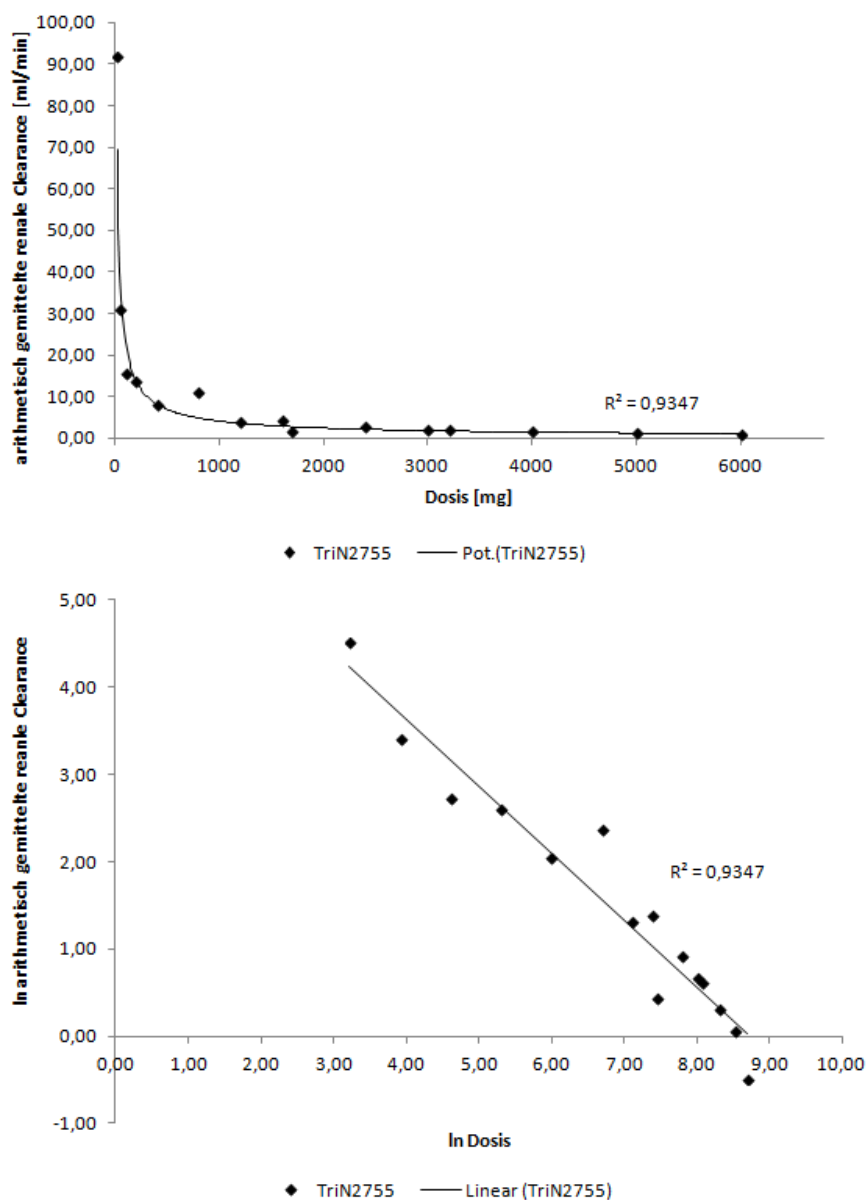


Abb. 28 Oben: Gemittelte  $C_{\max}$  aufgetragen gegen die verabreichte Dosis mit potenziellen Ausgleichsgeraden. Unten: Linearisierte Darstellung durch doppeltlogarithmische Auftragung

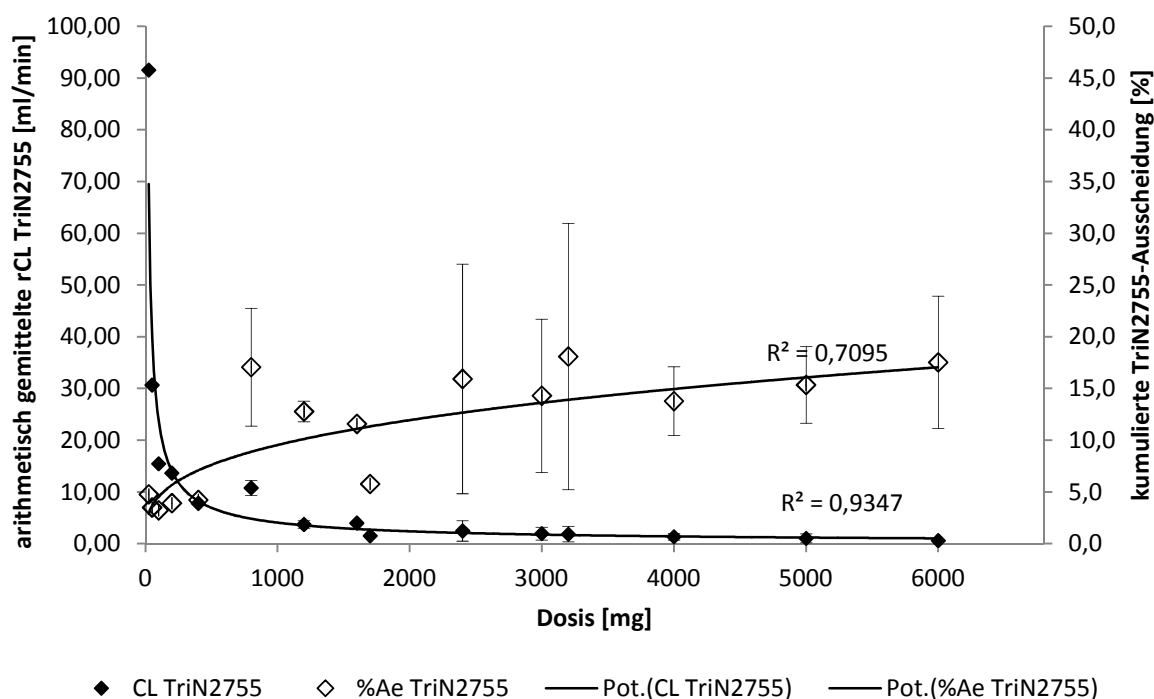
### 3.4.2 Clearance und Urinausscheidung

Für TriN2755 und seinen Metaboliten zeigten sich bei der Ausscheidung über den Urin große Unterschiede. Da vor allem die neu gefundenen Metaboliten nicht quantifiziert werden

konnten, war nur der Vergleich anhand der Peakflächen möglich, wobei unterschiedliche Absorptionsmaxima außer Acht gelassen wurden. Doch auch unter diesen Bedingungen zeigte sich deutlich, dass vor allem die neu entdeckten Sulfate (s. Kap. 3.6) mit dem Urin ausgeschieden wurden. Während geringe Mengen an Comp4 gefunden wurden, konnte Comp5 nur in Spuren im Urin nachgewiesen werden. Der Anteil an TriN2755 dagegen unterlag starken Schwankungen. Die Daten zur kumulierten prozentualen Ausscheidung von TriN2755 legten nahe, dass in Einzelfällen weniger als 5%, aber auch bis zu 1/3 der verabreichten Dosis, in unveränderter Form wieder ausgeschieden wurde. Betrachtet für alle Patienten zeigte sich jedoch, dass mit steigender Dosis tendenziell mehr TriN2755 wieder ausgeschieden wurde. Gleichzeitig sank die renale Clearance potenziell, wie in den Abbildungen 29 und 30 dargestellt.



**Abb. 29** Oben: Gemittelte  $CL_R$ (TriN2755) aufgetragen gegen die verabreichte Dosis mit potenzieller Ausgleichsgeraden. Unten: Linearisierte Darstellung durch doppeltlogarithmische Auftragung



**Abb. 30** Abhängigkeit der renalen Clearance und der renalen Ausscheidung von der verabreichten TriN2755-Dosis

Lediglich für die ersten beiden Patienten, die eine Dosis von 25mg bzw. 50mg TriN2755 erhalten hatten, wurde eine renale Clearance von 91,6ml/min bzw. 30,7ml/min gefunden. Die renale Clearance aller anderen Patienten bewegte sich in den Grenzen von 0,3 - 15,5ml/min. Die totale Clearance hingegen zeigte zwar interindividuelle Schwankungen, eine Abhängigkeit von der TriN2755-Dosis ließ sich jedoch nicht erkennen. In Tabelle 3.11 sind die Lage- und Streuungsmaße von %Ae sowie die der TriN2755-Clearances aller Patienten zusammengestellt.

Da von der verabreichten TriN2755-Dosis nicht auf die entstandenen Mengen an Comp5 und Comp4 geschlossen werden konnte, war die Angabe der totalen Clearance für Comp5 und Comp4 nicht möglich.

**Tab. 3.11** Clearance und kumulierte prozentuale Ausscheidung von TriN2755

	CL <sub>tot</sub> [ml/min]	CL <sub>R</sub> [ml/min]	%Ae [%]
Mittelwert	415,0	7,4	13,5
Standardabweichung	155,1	15,9	7,6
Median	388,5	2,2	12,7
Minimum	116,0	0,3	3,3
Maximum	739,0	91,6	35,4

### 3.4.3 Halbwertszeit und mittlere Verweildauer

Im Rahmen der Auswertung mit TopFit wurden die Plasmahalbwertszeiten von TriN2755, Comp5 und Comp4 berechnet. Diese bezogen sich auf die terminale Phase der Konzentrations-Zeit-Kurve nach dem Ende der Infusion. Die Halbwertszeit schien nicht in

direktem Zusammenhang mit der verabreichten Dosis zu stehen, denn über alle Dosisstufen wurden stark schwankende Halbwertszeiten berechnet. Die Mittelwerte der Plasmahalbwertszeiten lagen dabei für TriN2755 und Comp5 bei etwa 5 Stunden und für Comp4 bei 6,4 Stunden. Allerdings ergaben sich Halbwertszeiten von unter zwei bis zu 14,5 Stunden für TriN2755. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch für Comp4. Bei Comp5 lagen die Grenzen mit 2,3 bis 9,5 Stunden etwas enger zusammen (s. Tab. 3.12).

Auch bei der mittleren Verweildauer von Comp4 und Comp5 ergaben sich Differenzen von ca. 10 bzw. 15 Stunden zwischen Minimum und Maximum. Der Mittelwert lag jedoch bei beiden bei etwa 8 Stunden. Die mittlere Verweildauer von TriN2755 hingegen war dabei mit Grenzen von ein bis vier Stunden und einem Mittelwert von etwa 3 Stunden deutlich geringer.

**Tab. 3.12 Halbwertszeit und mittlere Verweildauer von TriN2755, Comp5 und Comp4**

	$t_{1/2}$			MRT		
	[h]	[h]	[h]	[h]	[h]	[h]
Substanz	TriN2755	Comp5	Comp4	TriN2755	Comp5	Comp4
Mittelwert	4,9	5,2	6,4	2,8	8,0	7,6
Standardabweichung	2,7	2,1	3,0	0,5	2,9	2,4
Median	4,2	4,7	5,5	2,8	7,4	7,7
Minimum	1,3	2,3	1,7	0,9	4,2	3,3
Maximum	14,5	9,5	16,6	3,9	19,1	13,5

#### 3.4.4 Verteilungsvolumen von TriN2755

Als weiterer Parameter zur Beschreibung der Pharmakokinetik wurde das Verteilungsvolumen im steady state, das die Summe aller berechneten Verteilungsräume im gewählten 3-Kompartiment-Modell darstellte, ermittelt. Von den erwähnten Verteilungsräumen wurde zusätzlich das Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment betrachtet. Auch hier zeigten sich starke interindividuelle Unterschiede, die nicht mit der Dosis in Zusammenhang standen. Wie auch schon bei der Clearance konnten für die Verteilungsvolumina von Comp5 und Comp4 keine Angaben gemacht werden. Um die Ergebnisse besser miteinander vergleichen zu können, wurden die Werte auf das Körpergewicht (KG) der Patienten bezogen und in Tabelle 3.13 zusammengefasst.

**Tab. 3.13 Auf das Körpergewicht normierte und unnormierte Verteilungsvolumina von TriN2755 im steady state**

	$V_c$ [l]	$V_{ss}$ [l]	$V_c/KG$ [l/kg]	$V_{ss}/KG$ [l/kg]
Substanz	TriN2755		TriN2755	
Mittelwert	8,6	15,4	0,12	0,20
Standardabweichung	5,8	5,1	0,09	0,08
Median	8,8	15,6	0,10	0,18
Minimum	1,1	7,1	0,01	0,08
Maximum	22,4	25,8	0,31	0,42

### 3.5 Statistische Auswertung

Obwohl bereits ein potentieller Zusammenhang sowohl zwischen der verabreichten Dosis und der AUC als auch zwischen Dosis und  $C_{max}$  gezeigt werden konnte, wurden diese Parameter



wie beschrieben normiert und mittels t-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ) zwischen männlichen und weiblichen Patienten überprüft. In den Tabellen 9.8 - 9.11 im Anhang wurden die normierten Werte für  $C_{\max}$  und AUC zusammengestellt. Aufgrund der geringen Stichprobenzahl konnte der t-Test nur für die AUC von Comp4 durchgeführt werden. In allen anderen Fällen konnte entweder die geforderte Normalverteilung oder die gleiche Varianz der beiden Messreihen nicht erfüllt werden. Wie Tabelle 3.14 zeigt, lag keiner der berechneten P-Werte unter dem vorgegebenen Signifikanzniveau von 0,05.

**Tab. 3.14 Ergebnisse der Signifikanztests für  $C_{\max}$  und AUC**

Parameter	Geschlecht	n	Median [ng/ml x kg]	P-Wert
$C_{\max}$ TriN2755	m	22	787,2	0,668
	w	16	644,1	
$C_{\max}$ Comp5	m	22	1335,9	0,745
	w	15	1507,2	
$C_{\max}$ Comp4	m	22	101,6	0,150
	w	15	128,1	

Parameter	Geschlecht	n	Median [ng x h/ml x kg]	P-Wert
AUC TriN2755	m	22	3581,8	0,135
	w	16	2650,6	
AUC Comp5	m	22	12731,1	0,841
	w	16	10947,5	

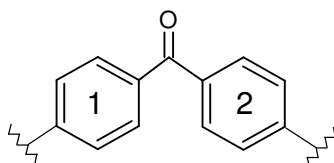
  

Parameter	Geschlecht	n	Mittelwert [ng x h/ml x kg]	P-Wert
AUC Comp4	m	22	883,4	0,522
	w	16	996,9	

### 3.6 Neue Metaboliten

#### 3.6.1 Einfluss der chemischen Struktur auf die UV-Absorption

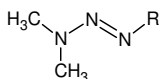
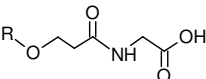
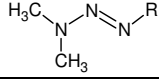
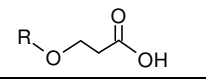
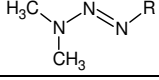
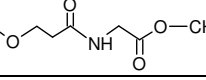
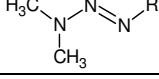
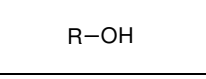
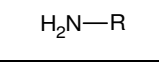
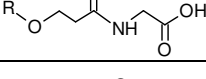
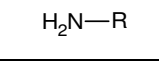
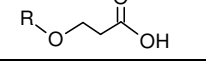
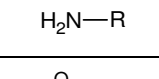
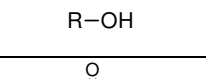
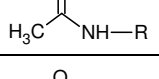
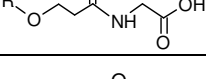
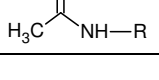
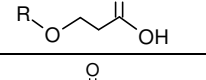
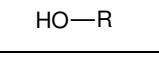
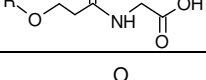
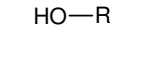
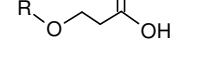
Wie bereits beschrieben, wurde zunächst anhand des Absorptionsspektrums versucht zu beurteilen, ob es sich bei einem unbekannten Peak um einen Metaboliten von TriN2755 handelte. Bei der Zusammenstellung der mittels PDA detektierten Absorptionsmaxima im Bereich von 200 - 400nm zeigte sich, dass vor allem der Substituent an Ring 1 (s. Abb. 31) maßgeblichen Einfluss auf die Wellenlänge des globalen Maximums in diesem Messbereich hatte (s. Tab. 3.15).



**Abb. 31 Gemeinsames Benzophenongrundgerüst der Referenzsubstanzen**

Bei Vorhandensein der Triazengruppe lag das Maximum bei etwa 344nm. Durch Verkürzung zur Aminogruppe wurde es zu etwa 325nm verschoben. Die N-acetylierten Äquivalente von Imp3 und Comp4 zeigten eine weitere Linksverschiebung zu etwa 302nm. Bei den beiden Referenzsubstanzen Imp1 und Imp4 mit phenolischer Hydroxylgruppe an Ring 1 war das Maximum schließlich zu etwa 298nm verschoben. Veränderungen der Seitengruppe an Ring 2 hatten dagegen kaum einen Effekt, da es sich mit Ausnahme von Imp2 und Imp10 auch nach der Verkürzung der Seitenkette weiterhin um einen Alkylarylether handelte. Weil außerdem kein aromatisches System an den Ether-Sauerstoff grenzte, hatten Modifikationen der Seitenkette nur einen geringen Einfluss auf das  $\pi$ -Elektronensystem des Benzophenongrundgerüsts und damit auch auf das Absorptionsmaximum der gesamten Verbindung.

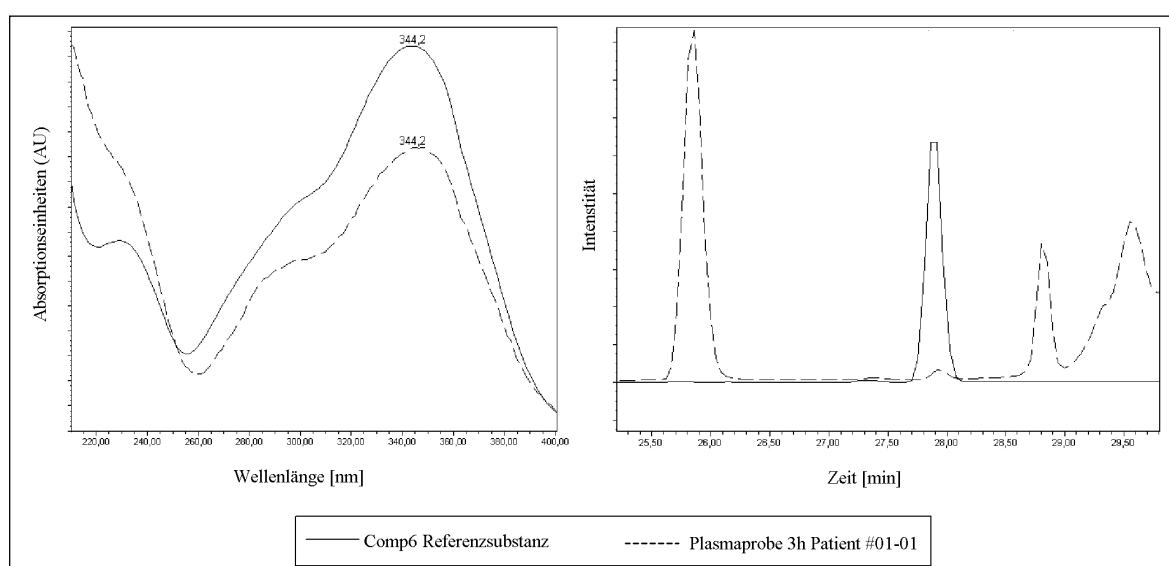
**Tab. 3.15 Übersicht über die Seitenketten der Referenzsubstanzen und die resultierenden Absorptionsmaxima**

Name	Ring 1	Ring 2	lokales Absorptionsmaximum [nm]	globales Absorptionsmaximum [nm]	Retentionszeit [min]
TriN2755			-	344,2	~25,6
Comp5			230,2	343,0	~28,6
Comp6			-	344,2	~27,7
Imp2			231,4	343,0	~27,1
Imp3			227,8	326,3	~6,0
Comp4			227,8	326,3	~10,9
Imp10			229,0	323,9	~7,0
Imp8			227,8	302,5	~7,5
Imp7			227,8	301,3	~13,5
Imp4			225,5	298,9	~7,7
Imp1			224,3	297,7	~14,0

### 3.6.2 Identifikation von Comp6

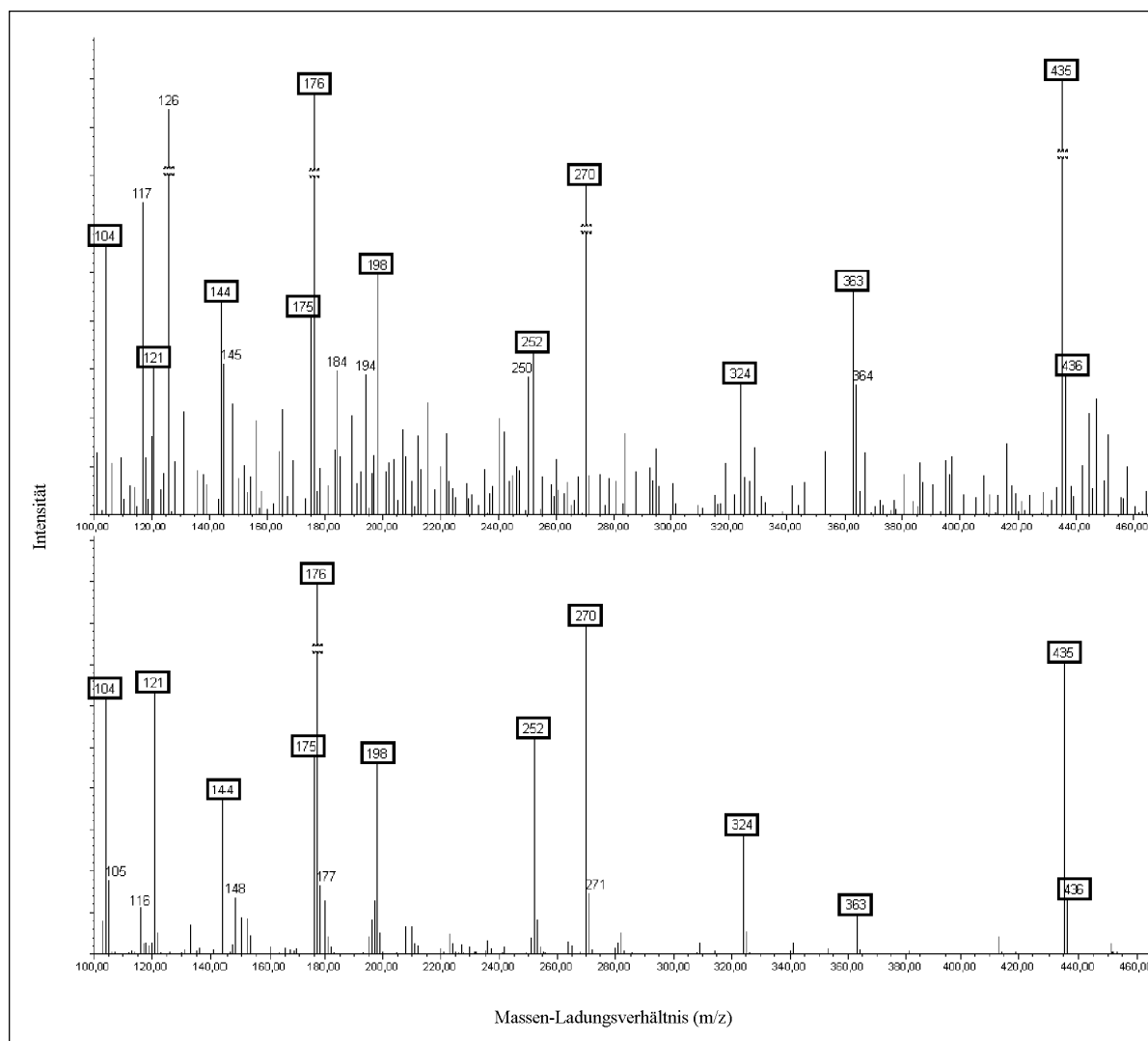
Die Substanz Comp6 war bereits zu Beginn der Studie bekannt und stellte chemisch den Methylester von TriN2755 dar. Hinweise darauf, dass Comp6 Teil des Metabolismus sein

könnte, lagen aus den präklinischen Versuchen jedoch nicht vor. Die Analyse der Plasmaproben von Patient #01-01 lieferte im SIR198 bei einer Retentionszeit von etwa 27,9min ein neues Signal, welches im Laufe der Infusion stark anstieg und anschließend wieder abfiel. Mit dem PDA konnte dieses Signal bei etwa 27,7min ebenfalls detektiert werden. Da diese Substanz jedoch mit einer anderen Verbindung koeluierte, die im Gegensatz zum MS im PDA ebenfalls sichtbar war, wurde ihr Absorptionsspektrum verfälscht. Erst die Messung der Proben von Patient #01-03 lieferte ein klareres Bild, da dieser Patient die vierfache TriN2755-Dosis erhalten hatte und der zu identifizierende Peak dadurch deutlich stärker ausgeprägt war. Mit einer zwischenzeitlich von der Firma Syngene International Ltd. bereitgestellten Referenzsubstanz, konnten die Retentionszeit, das Massenspektrum und das UV-Spektrum verglichen werden (s. Abb. 32).



**Abb. 32** Links: Vergleich der Absorptionsspektren des gefundenen Peaks und Comp6. Rechts: Vergleich der Retentionszeiten der Peaks im SIR198

Als Referenz wurde dazu eine wässrige Comp6-Lösung mit einer Konzentration von 1µg/ml verwendet, die nicht wie die Plasmaprobe zuerst aufgearbeitet werden musste, sondern direkt injiziert wurde. Trotz daraus resultierender Abweichungen zur Plasmaprobe konnte gezeigt werden, dass die Retentionszeiten der beiden Peaks im MS und die UV-Spektren im Wesentlichen übereinstimmten. Um dies abzusichern, wurde von beiden Proben ein Totalionenstrom (TIC) aufgenommen und die Massenspektren des fraglichen Peaks und Comp6 gegenübergestellt (s. Abb. 33). Zusätzlich zu der geringeren Sensitivität der TIC-Messung im Vergleich zur Einzelionendetektion, machte sich der Effekt der Probenmatrix und gleichzeitig eluierender Substanzen in einem erhöhten Rauschen bemerkbar, das sich über alle Massen erstreckte. Die Übereinstimmung der gebildeten Fragmente aus Plasmaprobe und Referenz waren jedoch klar erkennbar.



**Abb. 33** Oben: Massenspektrum von Plasma von Patient #01-01, 3h nach Start der Infusion, Retentionszeit 27,3min. Unten: Massenspektrum von Comp6 in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 1µg/ml

Es wurde eine Kalibriergerade erstellt, mit der es anschließend möglich war auch Comp6 quantifizieren. Auf eine aufwendige Validierung nach den ICH-Richtlinien wurde an dieser Stelle verzichtet, so dass diese Ergebnisse im Rahmen der Studie lediglich einen Hinweis auf den Metabolismus von TriN2755 und sein Verbleiben im menschlichen Körper liefern konnten.

### 3.6.3 Weitere methylierte Verbindungen

Im Laufe der Studie wurden aufgrund der Dosissteigerungen von TriN2755 in den Chromatogrammen immer größere und schärfer abgegrenzte Peaks zwischen denen der bereits bekannten Substanzen gefunden. Während die Absorptionsspektren große Ähnlichkeit mit jeweils einer der Referenzsubstanzen aufwiesen, zeigten sich in den Massenspektren zum Teil jedoch starke Abweichungen. Da in den meisten Fällen aber auch bekannte Massen zugeordnet werden konnten, bzw. Peaks aus den Einzelionendetektionen bekannt waren,

wurde von nur geringfügigen Modifikationen der Ausgangsverbindungen ausgegangen. Mit der Software ChemSketch (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Kanada) wurden die Strukturformeln daher analog zu Comp6 mit einer Methylgruppe versehen. Dadurch erhöhte sich deren molare Masse um 14g/mol. In vier von fünf Fällen konnte eine der resultierenden Massen in den Massenspektren nachgewiesen werden. Neben den protonierten Basispeaks konnten teilweise zusätzlich  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Addukte gefunden werden. Auf diese Weise gelang es jeder Referenzsubstanz mit einer freien Carbonsäure einen entsprechenden Methylester zuzuordnen. Neben dem bereits bekannten Comp6 waren dies die Ester von Imp3, Imp7, Imp8, Comp4 und Comp5 (s. Abb. 56 - 65 im Anhang).

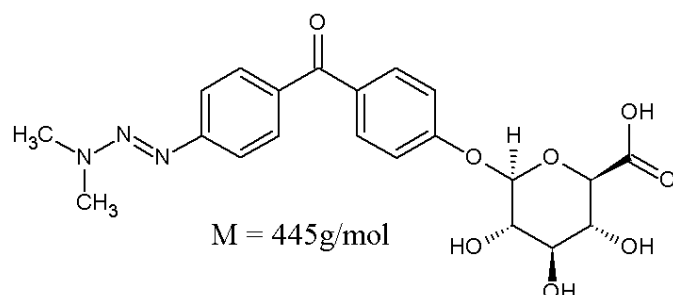
### 3.6.4 Metaboliten von Imp2 und Imp10

Ausgehend von den Strukturformeln der bereits bekannten Verbindungen schienen Imp2 und Imp10, aufgrund der freien phenolischen Hydroxylgruppe potenzielle Substrate für den Phase-II-Metabolismus zu sein. Daher wurden wie bereits beschrieben die UV- und Massenspektren von Imp2 und Imp10 mit entsprechenden Signalen unbekannter Verbindungen verglichen. Dabei wurden im Plasma und im Urin mehrere strukturverwandte Verbindungen entdeckt. Offensichtlich waren die Parameter des analytischen System für diese neu entstandenen Metaboliten jedoch suboptimal, da einige der Peaks noch vor oder erst nach den Referenzsubstanzen von der Säule kamen und so oft mit Bestandteilen der Matrix koeluierten. Zudem fielen einige der Peaks durch starkes Tailing, also verlängertes Eluieren von der Säule und dem resultierenden langsamen Abfallen des Detektorsignals, auf. Dies verbreiterte die Peaks und führte ebenfalls zu Koelutionen. Wurde jedoch ein bestimmter Metabolit vermutet, konnte dessen Molekulargewicht berechnet und nach dem entsprechenden Signal (sog. Molekülionenpeak) im Massenspektrum gesucht werden (s. Abb. 66 - 75 im Anhang).

#### 3.6.4.1 Imp2-Glucuronid

Vor allem im Urin fiel im PDA ein eher unscheinbarer Peak auf, der im SIR270 ein sehr großes Signal erzeugte. Das Maximum im Absorptionsspektrum lag bei 346,6nm, was nach der zuvor aufgestellten Tabelle zum Vergleich des Effekts der Seitenketten auf eine Triazenverbindung hinwies. Im TIC überwog wie erwartet die Intensität des Fragmentes  $m/z = 270$  alle anderen Signale (sog. Basispeak). Es wurde deshalb als Ausgangsverbindung von einem Metaboliten von Imp2 ausgegangen, der unter den im MS herrschenden Bedingungen Imp2 (Molekülmasse 269g/mol) als Hauptfragment bildete. Außerdem konnte das für die Triazenverbindungen ebenfalls typische Fragment mit  $m/z = 198$  identifiziert werden. Es wurden daher die Massen der beiden am naheliegendsten Metaboliten Imp2-Glucuronid und

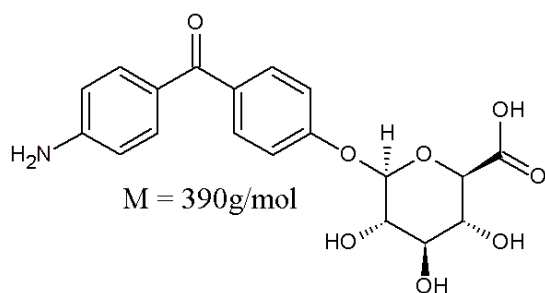
Imp2-Sulfat bestimmt (s. Abb. 34 und 37). Die entsprechenden, im MS detektierbaren Molekülonen hatten demnach eine molare Masse von 390 bzw. 446 g/mol. Im Massenspektrum konnten beide Massen gefunden werden. Allerdings hoben sie sich nicht von dem vorherrschenden Grundrauschen ab und hatten daher keine Aussagekraft. Innerhalb der Arbeitsgruppe gelang es jedoch durch die Inkubation des Enzyms UDP-Glucuronosyltransferase (s. Kap. 1.2.2.1) mit Imp2 und dem Cosubstrat UDP-Glucuronat Imp2-Glucuronid herzustellen. Dieses stimmte in allen überprüften Eigenschaften mit dem gefundenen Peak überein. Zudem war bei der Aufnahme des TICs der hergestellten Substanz das Grundrauschen geringer, wodurch das Signal bei  $m/z = 446$  eindeutig der Substanz zugeordnet werden konnte und damit das Vorliegen von Imp2-Glucuronid gesichert war.



**Abb. 34 Strukturformel von Imp2-Glucuronid**

#### 3.6.4.2 Imp10-Glucuronid

Da die Glucuronidierung von Imp2 möglich war, wurde im Anschluss nach einem Hinweis auf das Vorhandensein von Imp10-Glucuronid (s. Abb. 35) gesucht. Dieses konnte ebenfalls nach der oben geschilderten Vorgehensweise hergestellt werden. Aufgrund der verbesserten Wasserlöslichkeit im Vergleich zu Imp10 war Imp10-Glucuronid bereits nach etwa 3min im PDA sichtbar. Da in dieser Zeit auch viele der wasserlöslichen Matrixbestandteile von der Säule gespült wurden, koeluierte Imp10-Glucuronid in der Messung der Urinproben mit mindestens einer unbekannten Substanz. In den Plasmamessungen war das Signal ebenfalls überlagert, jedoch war der Peak dort besser zugänglich. Auch wenn sich der Kurvenverlauf des Absorptionsspektrums von dem des hergestellten Imp10-Glucuronids stark unterschied, wiesen beide ein Absorptionsmaximum bei etwa 330nm auf. Dies deutete auf das Vorliegen eines primären Amins hin. Das Massenspektrum der Vergleichssubstanz bestand im Wesentlichen aus einem Basispeak bei  $m/z = 214$ , einem zweiten, etwas kleinerem Signal bei  $m/z = 121$  und dem Molekülonenpeak bei  $m/z = 390$ . Obwohl die koeluiierenden Substanzen auch im MS die Auswertung der Massenspektren erschwerten und für ein erhöhtes Grundrauschen sorgten, konnte der Molekülonenpeak identifiziert und die Anwesenheit von Imp10-Glucuronid bewiesen werden.

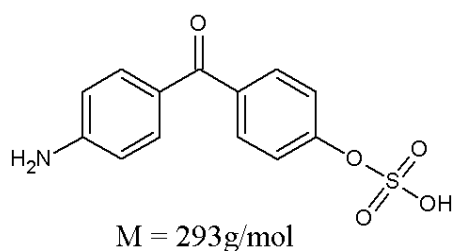


**Abb. 35 Strukturformel von Imp10-Glucuronid**

### 3.6.4.3 Imp10-Sulfat

Bereits in den Plasmaproben des ersten Studienpatienten #01-01 war im PDA ein Peak mit starkem Tailing bei etwa 8 Minuten zu erkennen. Mit der Steigerung der verabreichten Absolutdosis von TriN2755 stieg die Höhe des Peaks um ein Vielfaches an. Bedingt durch das Tailing sowie den Einfluss von koelutierenden Substanzen nahm auch seine Breite zu und erreichte in den Proben der Patienten, die die maximal verabreichte Dosis von 6000mg TriN2755 erhalten hatten, eine Breite von etwa 2,5 Minuten. Trotzdem bestand das Massenspektrum hauptsächlich aus zwei Signalen mit sehr großer Intensität bei  $m/z = 121$  und  $m/z = 214$  und ähnelte damit sehr stark dem Massenspektrum von Imp10. Die Masse eines sehr viel kleineren, aber isolierten Signals bei  $m/z = 294$  konnte nach der Modellierung mittels ChemSketch Imp10-Sulfat (s. Abb. 36) zugeordnet werden. Dieses Signal wurde daher als Basispeak von Imp10-Sulfat betrachtet.

Im Gegensatz zur Glucuronidierung hatte die Sulfatierung jedoch einen deutlichen hypsochromen Effekt auf das Absorptionsmaximum des UV-Spektrums. Im Vergleich zu Imp10 war es um ca. 10nm nach rechts verschoben und lag mit 333,5nm zwischen den Maxima der Triazene und denen der Amine.

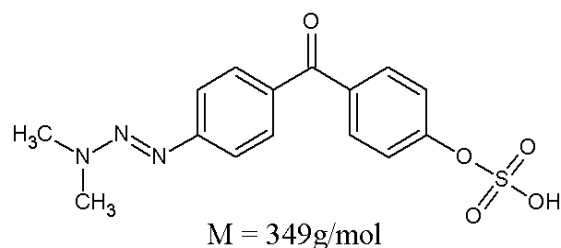


**Abb. 36 Strukturformel von Imp10-Sulfat**

### 3.6.4.4 Imp2-Sulfat

Nach der Retentionszeit von Comp5 fiel ebenfalls ein Peak durch eine sehr asymmetrische Form auf. Dieser war jedoch nicht von Anfang an zu erkennen und wurde erst nach einigen Dosissteigerungen sichtbar. Obwohl es auch hier wieder zu Koelutionen kam, entsprach das Absorptionsspektrum mit einem Maximum von 343nm denen der bereits bekannten Triazenverbindungen. Im Massenspektrum führte es jedoch zu einem erhöhten

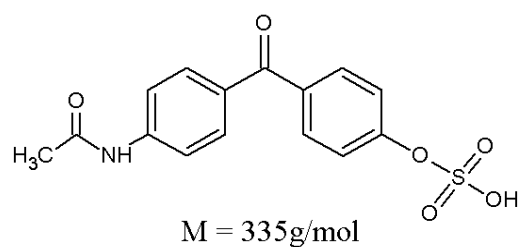
Grundrauschen und vielen Signalen deren Massen nicht zugeordnet werden konnten. Trotz dieser Umstände konnte eine große Übereinstimmung mit dem Massenspektrum von Imp2 festgestellt werden. Analog zu Imp10-Sulfat konnte auch hier das entsprechende Signal für sulfatiertes Imp2 gefunden werden, das sich aber aufgrund des Rauschen nicht eindeutig von den umliegenden Signalen abhob. Aufgrund der vielen Übereinstimmung wurde die Anwesenheit von Imp2-Sulfat (s. Abb. 37) jedoch als sehr wahrscheinlich angesehen.



**Abb. 37 Strukturformel von Imp2-Sulfat**

#### 3.6.4.5 N-Acetyl-Imp10-Sulfat

Im Urin der Patienten wurde ein weiterer Peak entdeckt, dessen Größe und Ausmaß des Tailings ebenfalls mit steigender TriN2755-Dosis zunahm und der dem Peak von Imp10-Sulfat immer mehr ähnelte. Er eluierte etwa zwei bis drei Minuten nach Imp10-Sulfat und war vor allem im SIR256 sowie im PDA zu sehen. Das Absorptionsmaximum lag bei 297,7nm und war im Vergleich zu Imp10 und Imp10-Sulfat um ca. 25 bzw. 35nm nach links verschoben und lag damit laut den zuvor gemachten Beobachtungen bereits im Absorptionsbereich der Phenole. Im TIC war neben einem großen Signal bei  $m/z = 256$  auch ein deutliches Signal bei  $m/z = 214$  zu erkennen, was für einen direkten Zusammenhang mit Imp10 sprach. Die Masse  $m/z = 256$  wurde ursprünglich nur dazu verwendet um Imp8, das N-Acetyl Derivat von Imp3, zu detektieren. Dabei entsprach die Masse dieses Fragments der von N-acetyliertem Imp10. Aufgrund der gefundenen Hinweise und der Gemeinsamkeiten mit Imp10-Sulfat, wurde davon ausgegangen, dass es sich um N-Acetyl-Imp10-Sulfat (s. Abb. 38) handelte. Die Masse des entsprechenden Moleküls konnte daraufhin im TIC als isoliertes Signal gefunden werden.

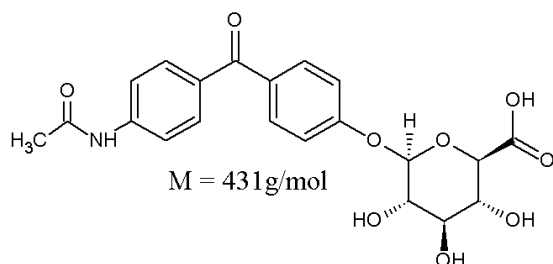


**Abb. 38 Strukturformel von N-Acetyl-Imp10-Sulfat**



#### 3.6.4.6 N-Acetyl-Imp10-Glucuronid

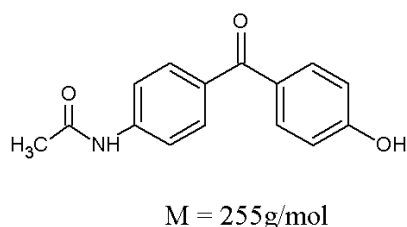
In der Nähe der Retentionszeit des zuvor beschriebenen Imp10-Glucuronids fiel im Urin ein weiterer Peak auf, dessen Absorptionsspektrum dem von N-Acetyl-Imp10-Sulfat sehr ähnlich sah und sein Maximum auch bei 297,7nm hatte. Aus diesen Gründen wurde das Massenspektrum nach Hinweisen auf N-Acetyl-Imp10-Glucuronid (s. Abb. 39) überprüft. Auch hier zeigte sich sehr große Ähnlichkeit zum acetylierten Imp10-Sulfat, wenn auch das Signal bei  $m/z = 214$  nicht sehr stark ausgeprägt war. Neben dem Basispeak bei  $m/z = 256$  konnte außerdem der zugehörige Molekülpeak bei  $m/z = 432$  gefunden werden.



**Abb. 39** Strukturformel von N-Acetyl-Imp10-Glucuronid

#### 3.6.4.7 N-Acetyl-Imp10

Da die Anwesenheit von acetyliertem Imp10-Glucuronid und -Sulfat in den Patientenproben nachgewiesen werden konnte, wurde abschließend versucht auch das Vorhandensein von N-Acetyl-Imp10 zu belegen. Im Urin wurde ein im Vergleich sehr kleiner Peak zwischen Imp10-Sulfat und N-Acetyl-Imp10-Sulfat gefunden, dessen Absorptionsspektrum denen der beiden N-acetylierten Verbindungen sehr nahe kam. Im Massenspektrum war eine eindeutige Zuordnung nicht möglich, da durch Überlagerungen der umgebenden Peaks und Koelutionen ein starkes Rauschen und sehr viele unbekannte Signale hoher Intensität zu sehen waren. Dennoch waren, wie auch bei den anderen acetylierten Imp10 Derivaten, Signale bei  $m/z = 214$  und  $m/z = 256$  klar zu erkennen, was das Vorhandensein von N-Acetyl-Imp10 (s. Abb. 40) bestätigte.



**Abb. 40** Strukturformel von N-Acetyl-Imp10

### 3.7 TriN2755 Flussdiagramm

#### 3.7.1 Quervernetzung

In dem bereits zu Beginn vorliegenden Verlaufsschema standen alle Metaboliten in mittelbarer bzw. unmittelbarer Beziehung zu TriN2755. Im Wesentlichen wurde dabei zwischen drei verschiedenen Reaktionen zu Folgeprodukten unterschieden. Dies waren die Umwandlung der Triazengruppe zum Phenol (Imp4) und zum primären aromatischen Amin (Imp3) sowie die Verkürzung der Seitenkette durch Hydrolyse der Amidbindung (Comp5). Aus diesen drei Verbindungen gingen in jeweils bis zu zwei weiteren Schritten alle anderen bekannten Metaboliten, mit Ausnahme von TriN2758, hervor. Auffällig war hier jedoch, dass trotz verwandter Strukturen keine Quervernetzungen zwischen den Metaboliten der einzelnen Pfade bestanden. Daher wurden einige wesentliche analoge Zusammenhänge ergänzt, die wie bereits bestehende Verbindungen mit gängigen Reaktionen des Phase-I Metabolismus erklärt werden konnten. Aus Imp3 ging demnach nicht nur Imp8 sondern auch Comp4 hervor, wenn statt der Acetylierung der Aminofunktion die Seitenkette verkürzt wurde. Wurde Comp4 nach seiner Bildung jedoch acetyliert, führte dies zu Imp7, das vorher nur mit Imp8 in Verbindung stand. Und da TriN2755 und Comp5 nach der Reaktion der Triazengruppe jeweils zu einem primären aromatischen Amin führten, wurde diese Verbindung zwischen Imp2 und Imp10 ebenfalls hergestellt. In Abbildung 41 wurde das aktualisierte Schema dargestellt, jedoch ohne Imp4 und Imp1, da es sich bei diesen beiden Verbindungen um Sonderfälle handelte.

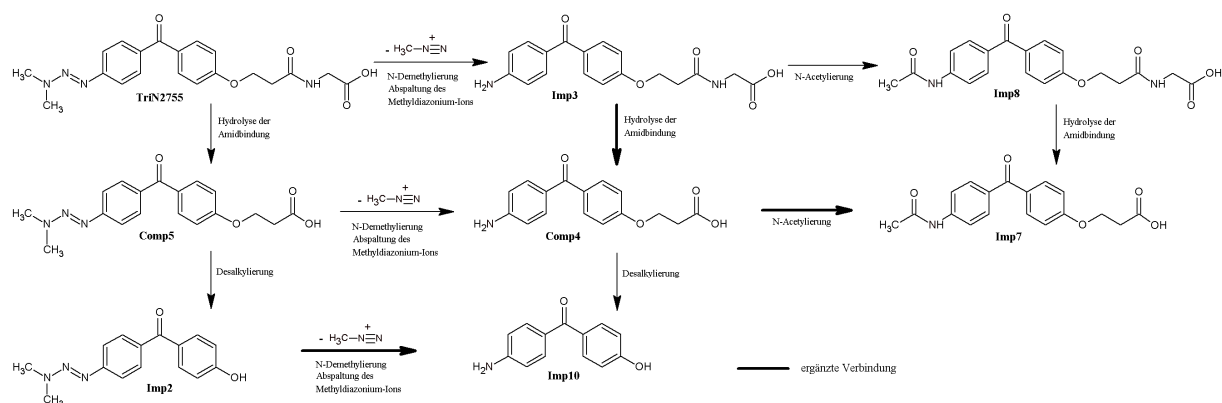
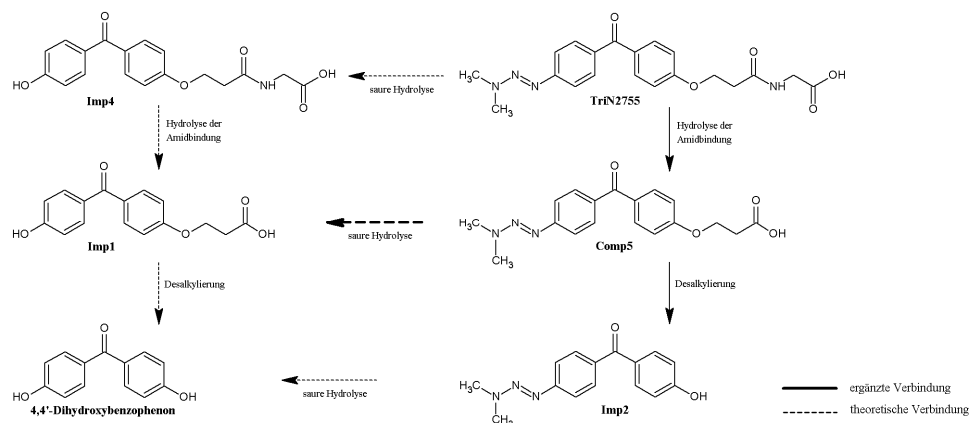


Abb. 41 Zusammenhang zwischen TriN2755 und den gebildeten Metaboliten ohne Imp1 und Imp4

#### 3.7.2 Imp4 und Imp1

In der Prognose für den humanen Metabolismus wurde Imp4 mit einem Anteil von 20% angegeben und wurde demnach zusammen mit Imp3 als Hauptmetabolit von TriN2755 angesehen. Es konnte jedoch zu keinem der Abnahmezeitpunkte Imp4 oder Imp1 in einer der Patientenproben detektiert werden. Im in vitro Versuch hingegen konnten die Phenolderivate durch die Inkubation in salzsaurer Lösung erzeugt werden, weshalb sie weiterhin als Teil des

Verlaufsschemas dargestellt wurden. Zudem wurde die Beziehung zwischen Comp5 und Imp1 ergänzt. Das Hydrolyseprodukt von Imp2 war entsprechend seines Aufbaus 4,4'-Dihydroxybenzophenon, welches zumindest theoretisch, analog zu Imp2 und Imp10, auch aus der Kettenverkürzung von Imp1 hervorgehen könnte. Wie Imp4 und Imp1 hatte es für die Studie jedoch keine Relevanz und wurde nur ergänzend aufgeführt (s. Abb. 42).



**Abb. 42 Zusammenhang zwischen Triazenen und Phenolderivaten**

### 3.7.3 Comp6 und weitere Methylester

Neben dem Nachweis von Comp6, dem Methylester von TriN2755, wurden ebenfalls Methylester der Metaboliten Comp5, Comp4, Imp3, Imp7 und Imp8, alle mit Carbonsäurefunktion in der Seitenkette, gefunden (s. Kap. 3.6.2 und 3.6.3). Dieser Schritt konnte jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keinem der im menschlichen Körper vorkommenden Enzymsysteme zweifelsfrei zugeordnet werden. Da es sich bei den entstandenen Verbindungen chemisch um Methyl-Alkylester handelte, wurde unterstellt, dass aus diesen durch Hydrolyse, auch vermittelt durch Hydrolasen, wieder die Ausgangsverbindungen entstehen konnten. Um die Reversibilität der Veresterung zu verdeutlichen, wurde die Verbindung zwischen den bekannten Substanzen und ihren Estern in Abbildung 43 mit Pfeilen in beide Richtungen dargestellt. Da jedoch nichts über den Bildungsort, Stabilität und Reaktivität dieser Methyl-derivate bekannt war, wurden diese im Flussdiagramm untereinander nicht verbunden, auch wenn analoge Reaktionen aufgrund identischer Strukturmerkmale vorstellbar waren (s. Abb. 43).

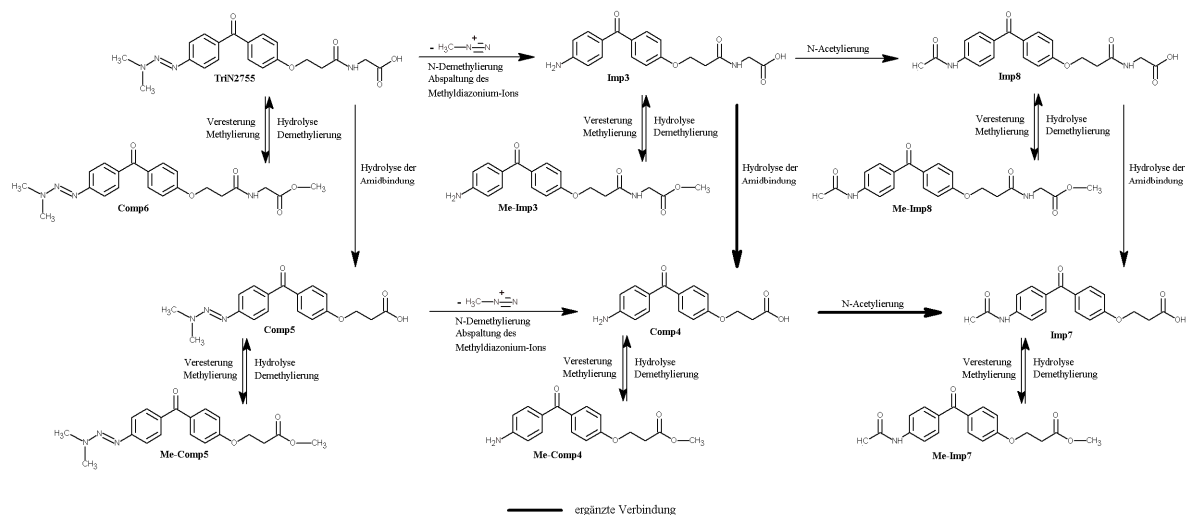


Abb. 43 Übersicht über die gebildeten Methylester ohne Imp1 und Imp4

Methylester von Imp1 und Imp4 ließen sich im Laborversuch in geringem Maße in salzsaurer Lösung durch die Zugabe von Methanol herstellen. Wie auch ihre Ausgangsverbindungen waren sie für die Studie nicht relevant, wurden aber zur Vervollständigung des Schemas mit angegeben (s. Abb. 44).

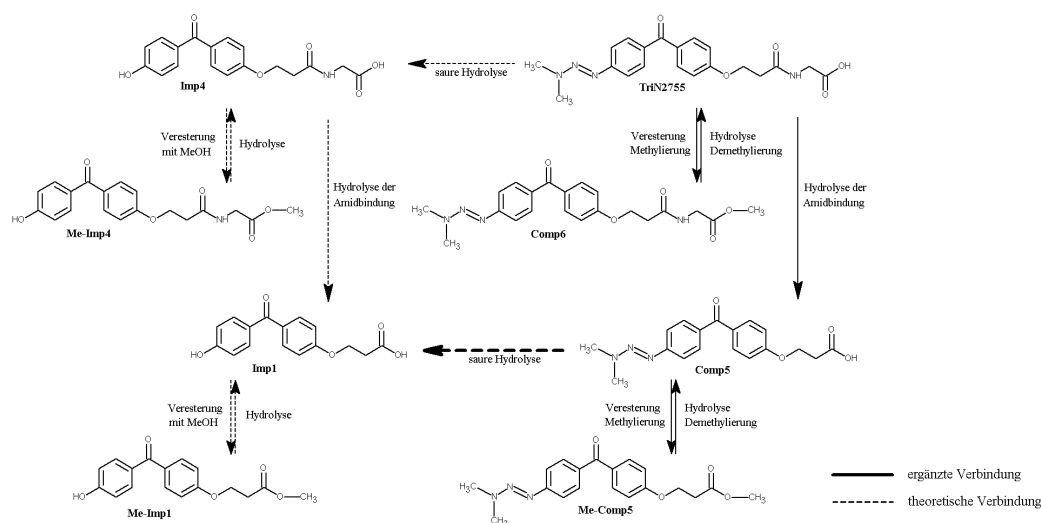
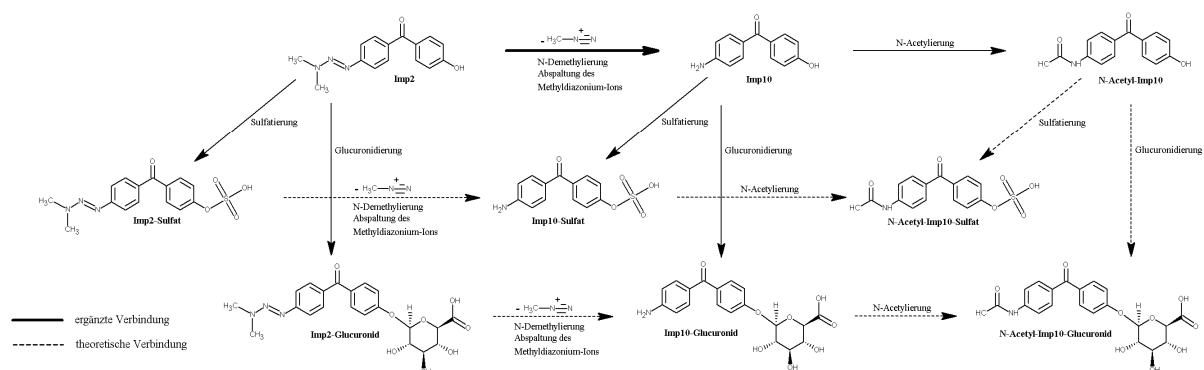


Abb. 44 Methylierungs- und Hydrolyseprodukte von TrN2755 und Comp5

### 3.7.4 Metaboliten von Imp2 und Imp10

Während in der ursprünglichen Prognose Imp2 und Imp10 als Endmetaboliten betrachtet wurden, waren diese aufgrund der freien Hydroxyl- bzw. Aminogruppe vor allem für Reaktionen des Phase-II-Metabolismus (s. Kap. 1.2.2), weshalb zwei Imp2-Derivate sowie fünf Phase-II-Metaboliten von Imp10 identifiziert werden konnten. Neben der Acetylierung des Aminostickstoffes im Falle von Imp10, spielten die Glucuronidierung und besonders die Sulfatierung der Hydroxylgruppe eine sehr wichtige Rolle. Die Anwesenheit von N-Acetyl-Imp10-Glucuronid bzw. -Sulfat deutete daraufhin, dass Imp10 hintereinander an beiden freien Gruppen modifiziert werden konnte. Ob diese Modifikationen jedoch in einer bestimmten

Reihenfolge erfolgen mussten, um diese Metaboliten zu erzeugen, war nicht bekannt. Daher wurden Quervernetzungen zwischen den neu gefundenen Metaboliten als möglich erachtet (s. Abb. 45).



**Abb. 45 Metaboliten von Imp2 und Imp10**

### 3.7.5 Aktualisiertes Flussdiagramm

Alle fehlenden Verbindungen und neu entdeckten Metaboliten wurden anschließend mit den Referenzsubstanzen in einem Gesamtschaubild zusammengefasst, das den derzeitigen Wissensstand zum Metabolismus von TriN2755 abbildete. Auch wenn einige Beziehungen noch nicht erklärt werden konnten, ergab sich ein komplexes Schema, in dem, ausgehend von TriN2755, bis zu fünf Metabolisierungsschritte dargestellt werden konnten. Im Zuge dessen wurde das ursprüngliche Schema von 10 auf 26 Substanzen ausgeweitet, deren Zusammenhänge in Abbildung 46 dargestellt wurden.



## **4 Diskussion**

### **4.1 Übersicht**

Triazene sind seit der Einführung des Dacarbazins in der Mitte der 70er Jahre auch heute noch Bestandteil vieler antineoplastischer Therapien. Während Temozolomid hauptsächlich zur Behandlung von Glioblastoma multiforme und metastasierenden Gliomen verwendet wird, kommt Dacarbazin bei der Therapie von Weichteilsarkomen, Hodgkin-Lymphomen und beim metastasierten malignen Melanom zum Einsatz. Dabei sind die Dosislimitierung durch gastrointestinale und myelosuppressive Nebenwirkungen und der Verlust der Wirksamkeit durch Resistenzen jedoch problematisch.

Das in der vorgestellten Studie als Prüfsubstanz verwendete Triazen TriN2755 zeigte laut der entwickelnden Firma TriN Pharma GmbH bereits schon in der präklinischen Prüfung Wirkung auf resistente Melanomzellen. Zudem konnten zytotoxische Effekte in verschiedenen Mamma- und 5-Fluorouracil resistenten Kolonkarzinomzelllinien beobachtet werden, die von den Versuchstieren gut toleriert wurden. Da es sich um eine „First-in-man“-Studie handelt, lagen zu Beginn der Arbeit auch zum Metabolismus und zur Pharmakokinetik von TriN2755 nur die Daten aus Zellkultur- und Tierversuchen vor. Aus diesen Versuchen sowie aus der Synthese von TriN2755, waren jedoch bereits erste Metaboliten und Abbauprodukte bekannt. TriN Pharma fasste die bekannten Verbindungen in einem Flussdiagramm zusammen und prognostizierte deren prozentualen Anteil an der insgesamt verabreichten TriN2755-Dosis für den Menschen.

Das Hauptziel dieser Arbeit war, abseits der klinischen Wirkung von TriN2755, dessen Pharmakokinetik sowie die seiner Metaboliten, insbesondere die der Hauptmetaboliten Comp5 und Comp4, zu beschreiben. Dazu wurden im Rahmen der Phase-I-Studie in einem Zeitraum von 24 bzw. 26 Stunden während und nach der Verabreichung der Studienmedikation Plasma- und Urinproben gesammelt. Nach Aufreinigung der Proben wurden die Konzentrationen der bereits bekannten Metaboliten mit Hilfe eines LC/MS-Systems quantifiziert. Zeitgleich wurde es genutzt um neue, noch nicht beschriebene Metaboliten zu identifizieren. So konnten neben der Untersuchung der Pharmakokinetik das vorgegebene Flussdiagramm erweitert und vervollständigt sowie die zuvor seitens TriN Pharma getroffene Prognose überprüft werden.

### **4.2 Messmethode**

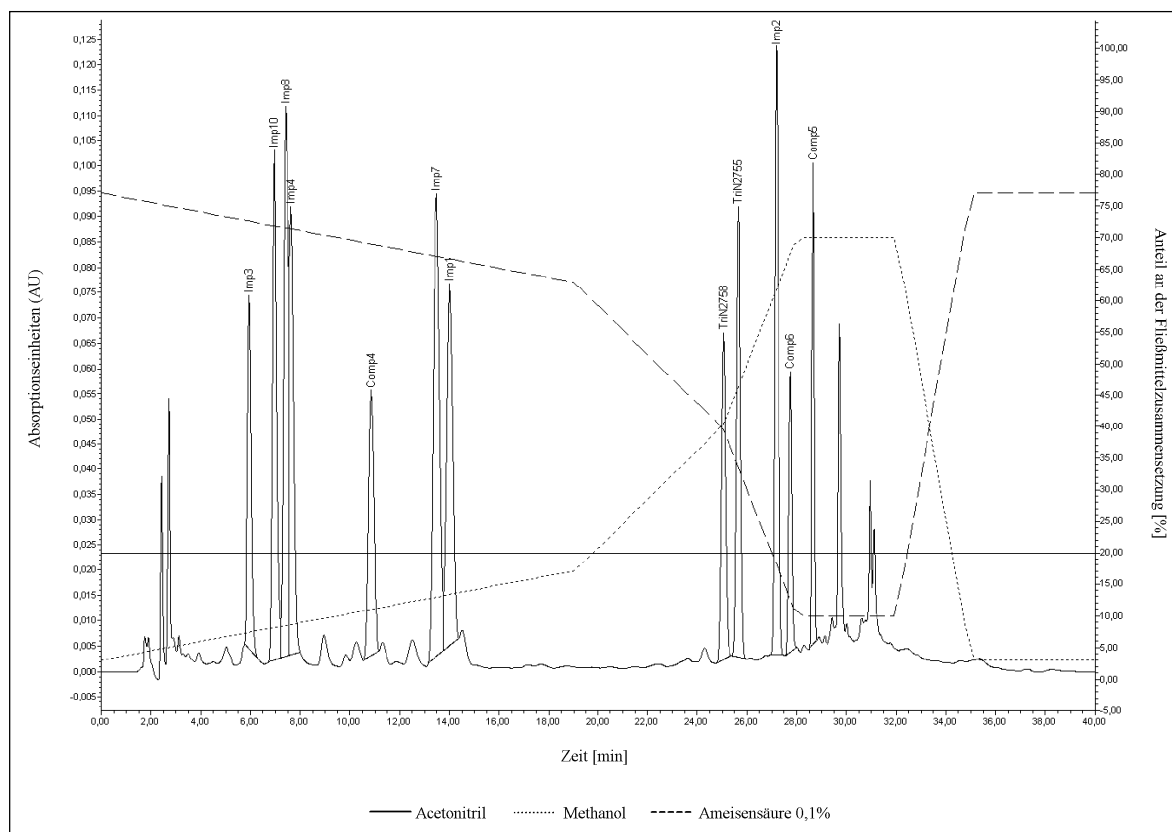
Bei der Entwicklung der benötigten HPLC-Methode konnte nicht erreicht werden, dass alle Referenzsubstanzen basisliniengetrennt eluierten. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die

anschließende Methodenvalidierung, die nach aktuell geltenden Standards durchgeführt wurde. Sie zeigte, dass es sich um eine valide Methode handelte, mit der durch die hohe Sensitivität des MS bis hin zu 0,3ng/ml detektiert werden konnten. Einzig für Imp10 ließ sich die Methode nicht validieren, da dessen gemessene Konzentrationen bei MS-Detektion teilweise sehr starken Schwankungen unterlagen und somit die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht gewährleistet werden konnte. Das erst später gefundene Comp6 wurde ebenfalls nicht validiert, konnte mittels des vorhandenen Standards aber identifiziert und über die erstellte Kalibriergerade auch quantifiziert werden.

Das für die Vorbereitung und Messung der Proben verwendete Verfahren wurde in Kapitel 2.3 bereits ausführlich geschildert. Im Folgenden soll daher nur auf einige wichtige Aspekte der Methode näher eingegangen werden.

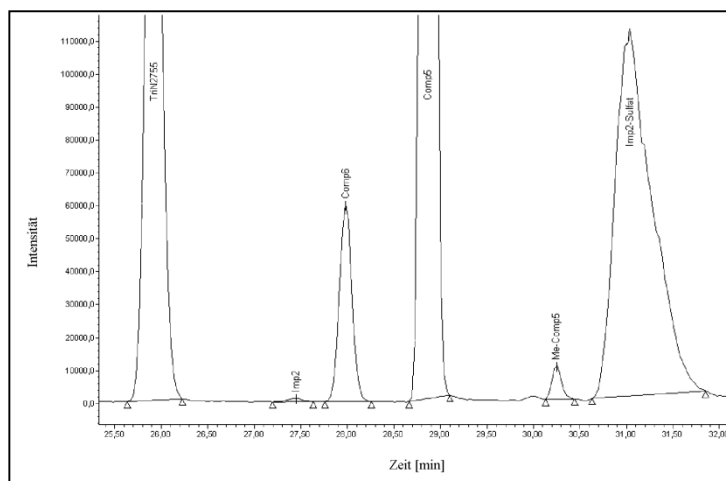
Für die Probenextraktion wurden Extraktionssäulen mit unterschiedlichen Füllmaterialien miteinander verglichen. Da sich bereits bei der Wasserlöslichkeit der Referenzsubstanzen erhebliche Unterschiede zeigten, wurde sich nach dem Vergleich der Extraktionsergebnisse für die Verwendung von HLB-Säulen, deren Füllmaterial sowohl aus lipophilen als auch aus hydrophilen Anteilen besteht, entschieden. Denn trotz des immer gleichen Benzophenon-Grundgerüsts, verfügen vor allem die hier geprüften Triazene über lipophile Eigenschaften, während bei den restlichen Referenzsubstanzen die Länge der Seitenkette einen entscheidenden Einfluss auf die Hydrophilie hat. Neben Imp10, das als Aminohydroxybenzophenon faktisch über keine Seitenkette mehr verfügt, sind vor allem die Substanzen, deren Seitenkette noch die Amidbindung enthält, am hydrophilsten. Dies spiegelt sich in dem für die HPLC verwendeten Fließmittelgradienten wieder, da erst mit zunehmenden organischen Anteil die Triazene eluiert werden konnten.





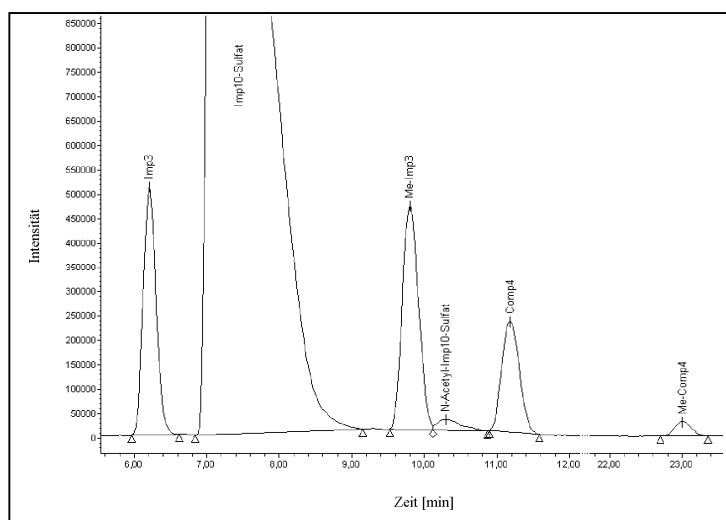
**Abb. 47 PDA-Chromatogramm aller Referenzsubstanzen mit einer Konzentration von jeweils 156,3ng/ml in Plasma. Zusätzlich wird die Zusammensetzung des Fließmittels im Verlauf der Messung dargestellt**

Die zweifache Aufreinigung mit Extraktionssäulen und Filterzentrifugenröhrchen während der Probenaufarbeitung bietet mehrere Vorteile. Der hohe Reinheitsgrad der gemessenen Proben sorgt vor allem im Messfenster zwischen Imp3 und Comp5 (s. Abb. 47) dafür, dass nur wenige Störsignale aus der Probenmatrix detektiert werden. Zugleich erleichtert dies auch die Zuordnung und Auswertung der Analyten-Peaks und verringert den Wartungsaufwand am Messsystem. Die Extraktion mittels HLB-Säulen dient durch das anschließende Trocknen der Proben gleichzeitig der Aufkonzentrierung, so dass die Bestimmung von Konzentrationen möglich ist, die sonst unterhalb der Quantifizierungsgrenze oder dem Detektionslimit liegen würden. Bei hohen verabreichten TriN2755-Dosen werden durch die Aufkonzentrierung für TriN2755 und seine Hauptmetaboliten jedoch so hohe Konzentrationen erreicht, dass sich deren Peakform in der HPLC zum Negativen verändert. Zudem kann es vorkommen, dass die Signale an das obere Limit der Detektoren stoßen und dadurch nicht mehr quantifizierbar sind. Beide Effekte treten beispielsweise bei Imp2- und Imp10-Sulfat auf, deren Peaks selbst bei der Analyse von nur 5µl der aufgearbeiteten Proben durch starkes Tailing eine Breite von bis zu 2 Minuten aufweisen wie in den Abbildungen 48 und 49 dargestellt.



**Abb. 48** Ausschnitt aus dem MS-Chromatogramm (SIR198) einer Plasmaprobe von Patient 41, 45' nach Infusionsende, 5µl Injektionsvolumen

Da die reine Überladung der Trennsäule für gewöhnlich zum entgegengesetzten Effekt, dem sog. Fronting führt, spielen für das Tailing der Peaks noch weitere Faktoren eine Rolle. Im Wesentlichen sind dies die Länge der Trennsäule, das gewählte Füllmaterial der Säule, die Zusammensetzung des Fließmittels sowie dessen pH-Wert. Das System scheint insgesamt suboptimal für die Bestimmung der Sulfate zu sein, was sich bereits bei geringen Konzentrationen andeutet, wie in Abbildung 49 am Beispiel des N-Acetyl-Imp10-Sulfat zu sehen ist.



**Abb. 49** Ausschnitt aus dem MS-Chromatogramm (SIR214) einer Plasmaprobe von Patient 41, 30' nach Infusionsende, 5µl Injektionsvolumen

Um auch ohne vorliegende Standards zumindest die Größenordnung der neu gefundenen Metaboliten einordnen zu können, kann mit der verwendeten Software mittels der bereits bestehenden Kalibriergeraden der Referenzsubstanzen und unter Berücksichtigung der Molekülmasse der gemessenen Metaboliten deren Konzentration in den Proben abgeschätzt werden. Vor dem Hintergrund der durchgeführten Validierung handelt es sich bei den daraus

ermittelten Werten selbstverständlich nicht um valide Daten, doch können diese, im Falle weiterführender Untersuchungen an TriN2755 und seinen Metaboliten, einen wichtigen Beitrag zur Optimierung der Messmethode liefern. So muss zum einen dafür gesorgt werden, dass Metaboliten geringer Konzentration weiterhin durch Aufkonzentrierung detektierbar bleiben. Zum anderen müssen zu Zeitpunkten, an denen Analyte in sehr hoher Konzentration vorliegen, diese auf ein quantifizierbares Maß reduziert werden. Es gibt zwei Möglichkeiten die Beladung der Trennsäule zu verringern. Bei der Extraktion kann ein geringeres Probenvolumen auf die Extraktionssäule aufgetragen werden und bei der anschließenden Messung können 5µl statt 200µl injiziert werden. Daraus resultiert ein Korrekturfaktor  $f_{Korr}$ , der bei der Auswertung von Empower2 berücksichtigt wird. Da für die Erstellung der Kalibriergeraden jeweils 3ml extrahiert und 200µl injiziert wurden, berechnet sich  $f_{Korr}$  für ein extrahiertes Probenvolumen  $V_{Ex}$  [ml] und ein injiziertes Volumen  $V_{In}$  [µl] nach folgender Formel:

$$f_{Korr} = \frac{3ml}{V_{Ex}} \times \frac{200\mu l}{V_{In}}$$

Zur Anpassung des chromatografischen Systems bestehen ebenfalls mehrere Optionen, die möglichst getrennt voneinander angewandt werden sollten, um deren Einfluss genau beurteilen zu können. Zur Verringerung des Tailings können ein niedrigerer pH-Wert des verwendeten Fließmittels sowie eine längere Trennsäule beitragen. Auch die Verwendung eines anderen Füllmaterials ist denkbar, doch muss in allen Fällen sichergestellt sein, dass die Trennung der schon geprüften Analyten nicht negativ beeinflusst wird. Die Quantifizierung der neuen Metaboliten ist bei den gegebenen Bedingungen jedoch nur möglich, wenn diese als Referenz vorliegen.

### 4.3 Metabolismus

Bereits vor Beginn der Phase-I-Studie war bekannt, dass TriN2755 einem extensiven Metabolismus unterliegt. In welchem Maß die bereits bekannten Verbindungen entstehen würden, konnte dabei von TriN Pharma jedoch nur aus den Ergebnissen der Tierversuche abgeleitet werden. Hinweise darauf, dass zusätzlich noch weitere Metaboliten entstehen, gab es zu diesem Zeitpunkt nicht. Im Plasma von Patient #01-01, der eine absolute Dosis von 25mg TriN2755 über die Infusionszeit von vier Stunden verabreicht bekam, wurden lediglich Comp5, Comp4, Imp3, Imp2 und Imp4 detektiert, wobei Imp4 sich im Nachhinein als Imp10-Sulfat herausstellte. Erst mit steigender Dosis konnten dann auch Imp7 und Imp8 gefunden werden. Wie bereits beschrieben, war auch das nachträglich identifizierte Comp6 in steigenden Mengen in den Chromatogrammen von Patient #01-01 und denen aller weiterer

Patienten zu sehen. Imp10 dagegen war, wenn überhaupt, nur in geringer Menge vorhanden, wofür es mehrere Gründe gibt, auf die im Weiteren noch eingegangen wird.

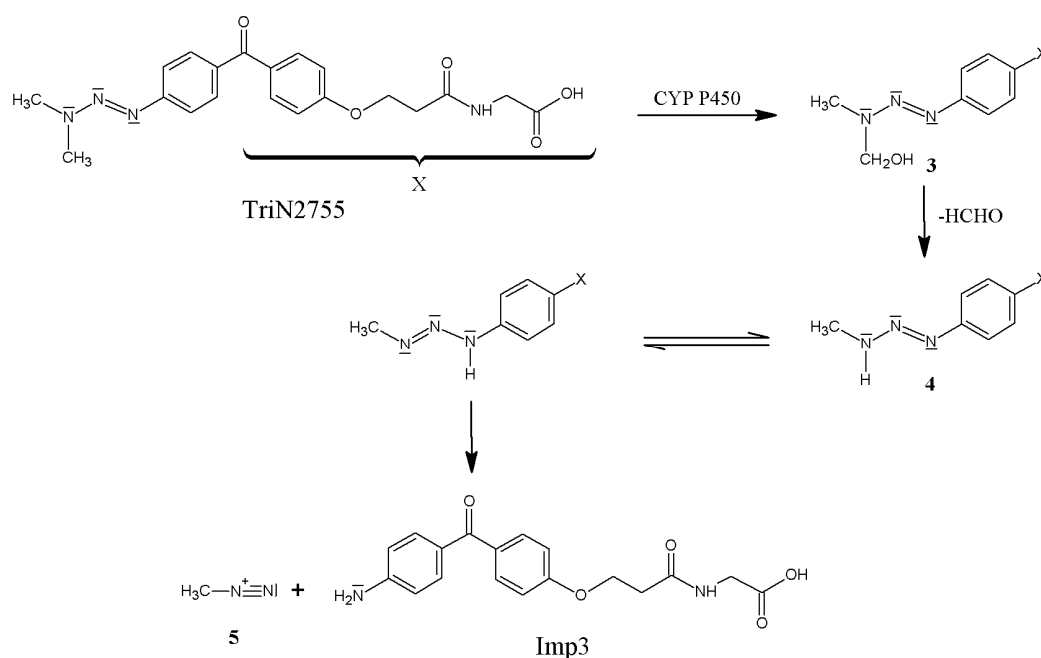
Die beiden phenolischen Derivate Imp1 und Imp4 hingegen können selbst bei Patienten, die 6000mg TriN2755 erhalten haben, nicht detektiert werden. Diese beiden Verbindungen entstehen durch die Hydrolyse von TriN2755 bzw. Comp5 in salzsaurer Lösung bei physiologischer Temperatur von 37°C. Das Hydrolyseprodukt von Imp2 wurde zudem als 4,4'-Dihydroxybenzophenon identifiziert, da es mit der einfach zu beziehenden Laborchemikalie verglichen werden konnte (Ergebnis nicht gezeigt). Obwohl seitens TriN Pharma die Vermutung bestand, dass ein Großteil von TriN2755 im Zuge des Metabolismus zu Imp4 verstoffwechselt werden würde, liefern die Messergebnisse keinen Hinweis darauf. Deshalb wurde der komplette linke Arm des aktualisierten Flussdiagramms (s. Kap. 3.7) als nicht relevant für die Verstoffwechselung von TriN2755 angesehen. In früheren Untersuchungen der Triazene konnten neben Phenolen jedoch auch primäre aromatische Amine als stabile Endprodukte gezeigt werden (Thust et al. 1991). Bezogen auf die untersuchten Triazene hätten demnach auch Imp3, Imp10 und Comp4 als Produkte der Hydrolyse gefunden werden müssen. Eine Erklärung dafür kann in der Struktur von TriN2755 gesehen werden, da das nach der Protonierung entstehende Ion (1) (s. Abb. 50) in das mesomeriestabilisierte Diazoniumion (2) zerfällt, dessen mesomere Grenzformeln durch zwei Strukturformeln angedeutet sind. Die Delokalisation der positiven Ladung kann aber über den Benzolring bis hin zur Carbonylgruppe ausgeweitet werden. Durch die Stabilisierung der Ladung entsteht ein relativ energiearmes und damit stabiles Zwischenprodukt. Wird, statt wie in (1) gezeigt, das Stickstoffatom vor dem Ring protoniert, sind die Zerfallsprodukte das resultierende primäre aromatische Amin sowie das sehr reaktive Dimethyldiazoniumion, das mit einer Halbwertszeit von unter einer Sekunde (Thust et al. 1991) sofort mit dem ihm umgebenden Wasser weiter reagiert. Im Fall von TriN2755 und den gewählten Bedingungen wird der energetisch günstigere Weg hin zu Imp4 offensichtlich bevorzugt. Der pH-Wert beeinflusst dabei lediglich die Umsatzgeschwindigkeit, hat aber keine Auswirkung auf die entstehenden Produkte. Bei neutralem und leicht basischem pH-Wert findet nahezu kein Umsatz von TriN2755 statt.



1. Da TriN2755 intravenös verabreicht wird, kann der Einfluss der sauren Hydrolyse der Triazengruppe bei einem physiologischen pH-Wert von etwa 7,4 vernachlässigt werden.
2. Bei den gefundenen Aminen handelt es sich um echte Metaboliten der Triazene, die nicht durch Hydrolyse entstanden sind.
3. Im Hinblick auf eine eventuell zukünftige Entwicklung einer oralen Arzneiform vergleichbar zu Temozolomid, das als Hartkapsel verabreicht wird, muss die Säurelabilität der Triazene bei der Passage des Magens unbedingt berücksichtigt werden.

91

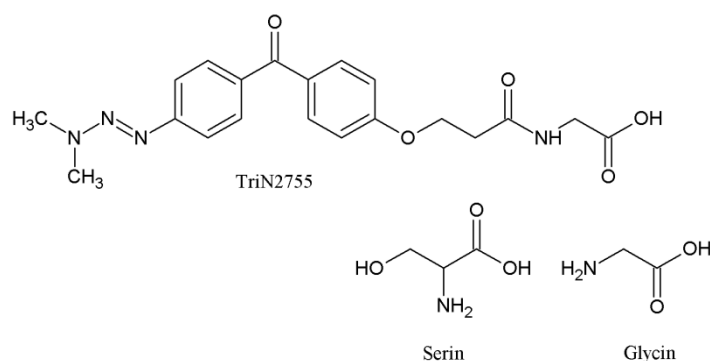
viel instabiler und zerfällt schließlich in das jeweilige Amin und das zuvor genannte Methyldiazoniumion, das für die zytotoxische Wirkung der Triazene verantwortlich gemacht wird. Da die einleitend erwähnte Inkubation von TriN2755 mit hepatischen Mikrosomen neben dem kettenverkürzten Comp5 auch die beiden entsprechenden Amine Imp3 und Comp4 lieferte, kann von einem analogen Aktivierungsmechanismus für TriN2755 und den daraus abgeleiteten Triazenen Comp6, Comp5 und Imp2 ausgegangen werden. Wie gut sich die hier vorgestellten Triazene jedoch als Substrat für die erwähnten CYP-Enzyme eignen und ob noch weitere bzw. andere Enzyme an der Aktivierung beteiligt sind, ist im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht worden. Die dabei entstehenden Amine werden jedoch als direkter Beweis für die stattgefundene Aktivierung der Triazengruppe angesehen.



**Abb. 51 Aktivierung der Triazengruppe durch CYP P450 und Freisetzung des Methyldiazoniumions am Beispiel von TriN2755 (nach Carvahlho 2000)**

Bereits vor Beginn der Studie wurde versucht mittels der in vitro Inkubation humaner Leukozyten mit TriN2755 erste Erkenntnisse über den extrahepatischen Metabolismus zu erhalten. Da Leukozyten neben den zuvor genannten Isoenzymen CYP1A1, 1A2 und 2E1 auch einige weitere Isoenzyme der Subfamilien A und B exprimieren (Furukawa et al. 2004), konnten bereits hier die Bildung der bekannten Metaboliten beobachtet werden. Es wurden jedoch nicht nur das aus TriN2755 hervorgehende Imp3 gefunden, sondern vor allem auch das kettenverkürzte Comp5 und das durch N-Acetylierung hervorgehende, ebenfalls kettenverkürzte Imp8. Auch wurden kleinere, aber zunehmende Mengen Imp4 detektiert, die in diesem Fall höchstwahrscheinlich hydrolytisch durch die andauernde Inkubation entstanden. Imp10 und seine Derivate sowie Methylester wie Comp6 konnten auch bei einer

retrospektiven Auswertung der Daten nicht gefunden werden. Dennoch besitzen Leukozyten neben der Monooxygenaseaktivität offensichtlich auch hydrolytische Enzyme zur Spaltung der Amidbindung sowie N-Acetyltransferasen, deren Substrate die durch die Aktivierung entstehenden Amine sind. Nach der Inkubationszeit von 26 Stunden liegt die Wiederfindung von TriN2755 noch bei etwa 36%. Addiert man die gefundenen Konzentrationen der beiden anderen Triazene Comp5 und Imp2, so zeigt sich, dass nur knapp 50% der vorgelegten Triazene im Laufe der Inkubation von den CYP-Enzymen umgesetzt wurden. Dass die Kapazität der Enzyme ausgelastet wurde, lässt sich primär auf die Höhe der eingesetzten Substratkonzentration zurückführen. Der langsame Umsatz der Triazene hingegen scheint auf einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in deren Metabolismus hinzudeuten. Das Fehlen von Comp6 in diesem Versuch bzw. das Vorhandensein der Methylester der Carbonsäurefunktion tragenden Analyten in den Blutproben kann bisher allerdings nicht erklärt werden. Diese wurden gleichermaßen für die langkettigen Verbindungen TriN2755, Imp3 und Imp8 sowie für das kettenverkürzte Comp5, Comp4 und Imp7 gefunden. Geht man hierbei von einer enzymatischen Reaktion aus, ist es fraglich, ob es sich um ein relativ substratspezifisches Enzym oder um zwei verschiedene Reaktionen handelt. Die in der Literatur beschriebenen und zum Teil auch im Fremdstoffwechsel aktiven Methyltransferasen wie Phenol- oder Catechol-O-Methyltransferase legen allerdings ein sehr eingeschränktes Substratspektrum nahe. Zudem existieren weitere Methyltransferasen, die Methylgruppen gezielt auf Schwefelatome oder Stickstoffe in Aminosäuren wie z.B. Histon-Methyltransferasen übertragen und daher ebenfalls nicht in Frage kommen. Vergleicht man die beiden Seitengruppen mit den Standardamino­säuren, so weist die kurze Kette als 3-Hydroxypropansäure trotz fehlender Aminogruppe große Ähnlichkeit zu Serin auf. An diese ist in der längeren Kette Glycin per Amidbindung angehängt, wie Abbildung 52 verdeutlicht.

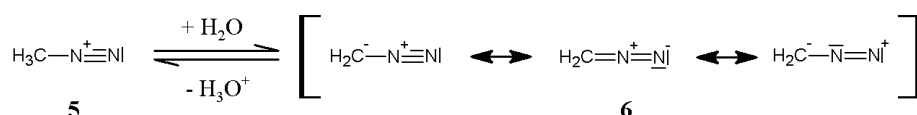


**Abb. 52 Vergleich der Seitenkette von TriN2755 mit den Aminosäuren Serin und Glycin**

Damit stellen die vollständige und die verkürzte Seitenkette jedoch auch keine Substrate für die in Eukaryoten vorkommenden Proteinmethyltransferase der Typen II – IV (Clarke 1993)

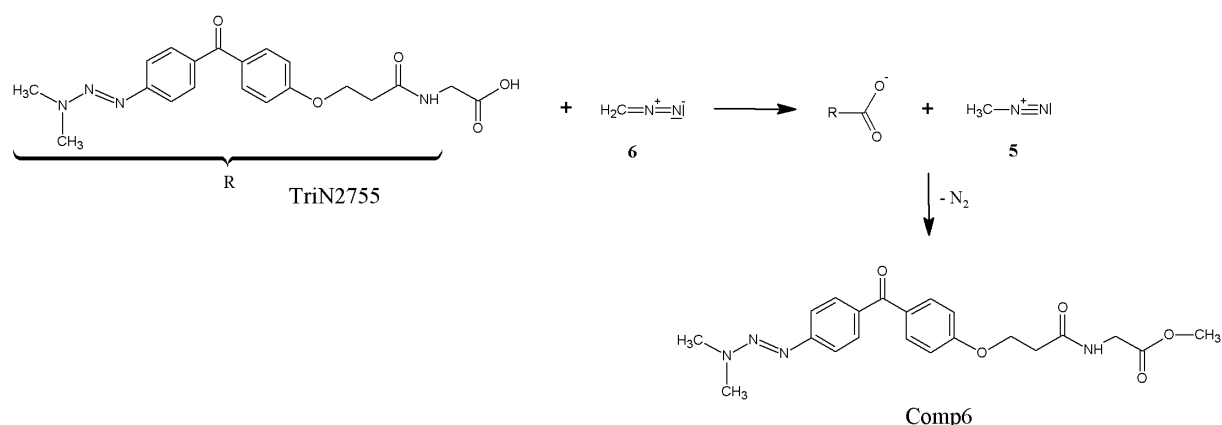
dar. Wie von Paik et al. beschrieben, handelt es sich dabei um hoch spezifische Reaktionen, in denen wie in vielen anderen endogenen Methylierungen S-Adenosylmethionin als Cosubstrat dient. Gleichzeitig konnte aber auch gezeigt werden, dass SAM zu nicht enzymatischer Methylierung verschiedenster Proteine in der Lage ist (Paik et al. 1975). Ob dies in vivo unter physiologischen Bedingungen mit TriN2755 und seinen Metaboliten ebenfalls möglich ist, kann der Arbeit von Paik allerdings nicht entnommen werden.

Einen anderen möglichen Erklärungsansatz für die Entstehung der Methylester liefern die Arbeiten von Smith et al. und von Huisgen und Koch. Sie konnten belegen, dass freigesetzte Methyldiazoniumionen in gepufferter, wässriger Lösung neben der „Methylierung“ der Wassermoleküle ebenfalls in der Lage sind Protonen mit ihrer Umgebung auszutauschen (Smith et al. 1985), woraus Diazomethan (6) (s. Abb. 53) resultiert.



**Abb. 53 Dissoziationsgleichgewicht des Diazoniumions (nach Huisgen und Koch 1954, Smith 1985)**

Laut Huisgen und Koch führt die Reaktion von Diazomethan und Carbonsäuren zur Bildung von Methylestern, wobei als charakteristisches Zwischenprodukt wieder das Methyldiazoniumion entsteht (Huisgen et Koch 1955). Bezogen auf TriN2755 würde dies bedeuten, dass durch Aktivierung der Triazengruppe freigesetzte Diazoniumionen statt mit DNA-Basen mit in der Nähe befindlichen Metaboliten oder weiteren TriN2755-Molekülen reagieren und dadurch ihre zytotoxische Wirkung verlieren. Die Hydrolyse des Esters liefert als Produkte lediglich wieder die freie Carbonsäure sowie Methanol.



**Abb. 54 Bildung von Comp6 aus TriN2755 und Diazomethan (modifiziert nach Huisgen und Koch 1954)**

Ausgehend von den entstehenden DNA-Addukten, die beim Einsatz von Triazenen gefunden wurden (Beranek 1990) und den möglicherweise hier entstehenden Methylestern, ist die



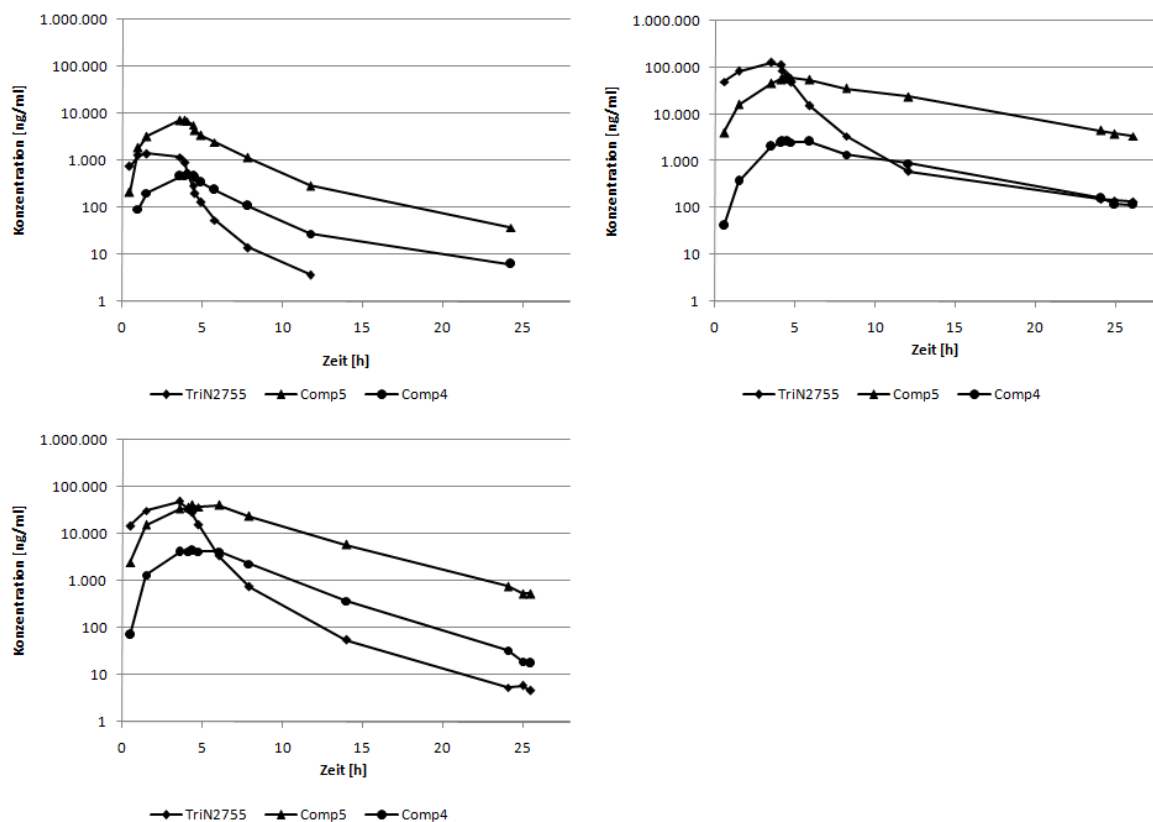
Methylierung auch an anderen Stellen an den Molekülen von TriN2755 und seinen Metaboliten nicht ausgeschlossen. Hinweise auf die Methylierung einer Amino- oder Hydroxygruppe einzelner Metaboliten konnten im Zuge der Auswertung jedoch nicht gefunden werden. Stattdessen wurde als einziges weiteres Stoffwechselprodukt der Amine die jeweils N-acetylierte Verbindung gefunden. Als Phase-II-Metaboliten der Phenole konnten dagegen Sulfate und Glucuronide identifiziert werden. Einen Sonderfall stellt Imp10 dar, das aus der Abspaltung der kompletten Seitenkette und der Aktivierung der Triazengruppe resultiert. Die freie Amino- und Hydroxygruppe macht es somit zum Substrat für Glucuronidasen, Sulfatasen und N-Acetylasen. Da keine N-Glucuronide gefunden wurden, resultierten aus den möglichen Kombinationen fünf weitere Imp10-Derivate, die alle nachgewiesen werden konnten. In Plasma und Urin lagen die beiden Glucuronide Imp10-Glucuronid und N-Acetyl-Imp10-Glucuronid sowie N-Acetyl-Imp10 wenn überhaupt nur in Spuren vor. Für Imp2-Sulfat und vor allem für Imp10-Sulfat wurden dagegen sehr große Signale detektiert, die wie auch TriN2755 und Comp5, teilweise das Detektorlimit erreichten. Wie von Cappiello et al. gezeigt werden konnte, findet die Sulfatierung im Wesentlichen in der Leber statt, da die dort gefundenen Sulfotransferasen eine sehr viel höhere Aktivität aufweisen als solche, die in extrahepatischen Geweben vorkommen (Cappiello et al. 1989). In der Leber befindet sich auch der größte Speicher des benötigten Cosubstrates 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat. Dieses kann jedoch bei hohen Substratkonzentrationen innerhalb einer Minute aufgebraucht werden, so dass der Bedarf an PAPS nur durch die schnelle Synthese aus anorganischem Sulfat gedeckt werden kann. Doch auch dieser Vorrat kann bei einer entsprechend hohen verabreichten Wirkstoffdosis erschöpft werden. Die Bereitstellung von anorganischem Sulfat ist daher ab diesem Punkt der kapazitätslimitierende Faktor (Klaassen et Boles 1997). Eine weitere Steigerung der Wirkstoffdosis führt dann zur vermehrten Glucuronidbildung. Im Falle einer weiter steigenden TriN2755-Dosis ist dies aufgrund der vorliegenden Daten ebenfalls denkbar. Die Entstehung verschiedener Glucuronide konnte zwar anhand der Plasma- und Urindaten gezeigt werden, auf die gebildeten Konzentrationen lässt sich daraus aber nicht schließen. Da die Glucuronide im Gegensatz zu den Sulfaten auch in größerer Menge über die Galle in den Darm gelangen und nach Abspaltung des Glucuronylrestes wieder resorbiert werden können, lassen sie sich auch durch die Untersuchung der Fäzes nur teilweise verfolgen. Zudem kann nach der erneuten Resorption die Sulfatierung erfolgen, wodurch im Urin gemessene Sulfatkonzentrationen überschätzt werden (Mulder 1990). Der Abnahmezeitpunkt, bei dem die jeweils höchste Konzentration an Imp2- und Imp10-Sulfat gemessen wurde, variierte von Patient zu Patient, lag aber immer zwischen fünf Minuten und 2 Stunden nach Infusionsende.

#### 4.4 Pharmakokinetik

Über alle Dosisstufen hinweg zeigt TriN2755 einen charakteristischen Verlauf der Konzentrations-Zeit-Kurve. Die Maximalkonzentration liegt dabei immer zwischen 3:30 Stunden nach Infusionsstart und 5 Minuten nach Infusionsende. Im Gegensatz dazu erreicht Comp5 seine Maximalkonzentration erst im Anschluss zwischen 5 und 45 Minuten nach Ende der Infusion. Dass kein festes Verhältnis zwischen den beiden Konzentrationen besteht, wird bereits dadurch deutlich, dass nur bei 30 von 37 auswertbaren Patienten eine höhere Maximalkonzentration für Comp5 als für TriN2755 ermittelt wurde. Die Spanne des errechneten Quotienten  $C_{\max}(\text{Comp5})/C_{\max}(\text{TriN2755})$  schwankt von einem Drittel bei Patient #01-31, der 6000mg TriN2755 erhalten hatte, bis hin zum 29-fachen der TriN2755-Konzentration im Fall von Patient #01-32, dem eine Dosis von 1700mg verabreicht wurde. Ein ähnliches Bild bietet auch der Vergleich der jeweiligen AUCs. In einem Fall war die AUC von Comp5 geringer als die von TriN2755, in allen anderen Fällen war sie um bis zum 11-fachen größer. Selbst für die Patienten, die zwischen 25mg und 800mg TriN2755 verabreicht bekommen haben, ergab sich kein konstantes Verhältnis, obwohl hier zumindest noch von einem linearen Zusammenhang von verabreichter Dosis und gemessenen Plasmakonzentrationen ausgegangen wurde. Gleiches gilt auch für die AUCs und Maximalkonzentrationen von Comp4 bezogen auf die entsprechenden Messwerte für Comp5. Die AUC von Comp5 beträgt unabhängig von der verabreichten Dosis etwa das 8 - 40-fache der AUC von Comp4. Beim Vergleich von  $C_{\max}$  liegt diese Spanne sogar zwischen dem 6 - und 180-fachen.

Die berechneten  $C_{\max}$ - und AUC-Werte für alle drei Substanzen wurden nach Normierung auf die verabreichte Dosis pro Gewicht des Patienten auch hinsichtlich geschlechtsspezifischer Unterschiede untersucht. Der Vergleich der Daten von 22 männlichen und 15 bzw. 16 weiblichen Patienten zeigt jedoch weder einen signifikanten Unterschied noch einen Trend bezüglich der für die statistischen Verfahren ermittelten Mediane bzw. des Mittelwertes der AUC von Comp4. Auf Grundlage der vorliegenden, geringen Stichprobenmenge scheint das Geschlecht der Patienten zumindest für den in der Studie überprüften Konzentrationsbereich nicht von Bedeutung für den Metabolismus von TriN2755, Comp5 und Comp4 zu sein.

Trotz der aufgeführten interindividuellen Unterschiede, zeigt die Konzentrations-Zeit-Kurve von Comp4 einen charakteristischen Verlauf, der dem von Comp5 weitestgehend gleicht und in der terminalen Phase bei halblogarithmischer Darstellung parallel zu Comp5 abfällt wie in Abbildung 55 beispielhaft für drei verschiedene TriN2755-Dosen dargestellt.



**Abb. 55** Oben: Logarithmierte Konzentrations-Zeit-Kurven von Patient #01-03 (200mg) und Pat #01-35 (6000mg). Unten: Logarithmierte Konzentrations-Zeit-Kurven von Patient #01-10 (3200mg)

Laut der Arbeit von Houston und Taylor deutet dies darauf hin, dass der Metabolismus von Comp5, der u.a. Comp4 als direkten Metaboliten liefert, limitierend auf die Konzentration von Comp4 wirkt. Demnach ist die Halbwertszeit von Comp4 geringer als die von Comp5, gleicht sich durch die besagte Abhängigkeit jedoch an die Halbwertszeit von Comp5 an (Houston et Taylor 1984). Die mittels TopFit errechneten Werte ergeben durchschnittlich eine etwas höhere Halbwertszeit von 6,4 Stunden für Comp4 im Vergleich zu 5,2 Stunden für Comp5. Eine ähnliche lange Halbwertszeit von 4,9 Stunden wurde auch für TriN2755 berechnet. Doch obwohl hier der Umsatz zum direkten Metaboliten Comp5 sehr schnell abläuft und dadurch zum Teil sogar höhere Spitzenspiegel als für TriN2755 gefunden werden, zeigen sich auch hier parallele Verläufe der Konzentrations-Zeit-Kurven in der terminalen Phase.

Der schnelle Umsatz von TriN2755 als auch dessen Ausscheidung im Urin spiegeln sich jedoch in der mittleren Verweildauer wieder. Diese trifft unter Berücksichtigung aller im Körper ablaufenden kinetischen Prozesse eine Aussage darüber wie lange ein Molekül in unveränderter Form im Körper verweilt. Die für TriN2755 ermittelte MRT beträgt durchschnittlich nur etwa 3 Stunden und bewegte sich unabhängig von der Dosis nur in engen Grenzen. Eine Betrachtung des über den Urin ausgeschiedenen Anteils an TriN2755 zum

frühesten Zeitpunkt der Probennahme nach Infusionsende zeigt, dass bei 31 von 37 auswertbaren Patienten, in der Zeit vom Start der Infusion bis zu 80 Minuten danach, bereits mindestens 75% der insgesamt über den Urin ausgeschiedenen Menge gefunden werden. 19 Patienten hatten in dieser Zeit sogar bereits mehr als 90% der über den Zeitraum von 26 Stunden kumulierten Menge an TriN2755 ausgeschieden. Dies erklärt das schnelle Abfallen der TriN2755-Konzentration im Blut nach Infusionsende, doch scheint die Exkretion im weiteren Verlauf dann nicht mehr im Vordergrund zu stehen. Trotz interindividueller Schwankungen deutet sich jedoch an, dass der exkretierte Anteil mit steigender Dosis zunimmt. Im Gegenzug sinkt die renale Clearance von TriN2755, da aufgrund der steigenden Spiegel im Plasma pro Zeiteinheit ein immer geringeres Plasmavolumen vollständig von TriN2755 befreit werden kann. Nicht außer Acht gelassen dürfen hierbei jedoch weitere Faktoren wie Alter, Geschlecht, die Einnahme zusätzlicher Medikamente sowie die maligne Grunderkrankung und bereits durchgeführte Chemotherapien, die ebenfalls Einfluss auf die Nierenfunktion haben.

Die Verteilung in tiefere Kompartimente bzw. das Fettgewebe kann mit Hinblick auf das errechnete Verteilungsvolumen jedoch ausgeschlossen werden. Die auf das Gewicht bezogenen Werte von 0,20l/kg für die Verteilung von TriN2755 im steady state bzw. der zu diesem Zeitpunkt im zentralen Kompartiment vorliegende Anteil von 0,12l/kg legen nahe, dass neben der Verteilung im Plasma nur von einer Weiterverteilung in die interstitielle Flüssigkeit ausgegangen werden kann. Das Verteilungsvolumen von TriN2755 liegt damit in der Größenordnung von anderen Carbonsäurefunktion tragenden Wirkstoffen wie beispielsweise Acetylsalicylsäure (Bryson 1996). Aufgrund ihrer Polarität und der damit verbundenen Hydrophilie werden sie nicht in das Fettgewebe aufgenommen, was durch die kurze MRT von nur etwas drei Stunden bereits angedeutet wird.

Da bei allen Patienten nur geringe Mengen des nach der Aktivierung von TriN2755 verbleibenden Imp3 gefunden wurden, ist die Kettenverkürzung von TriN2755 zu Comp5 vor der Aktivierung offenbar neben der Exkretion der wichtigste erste Schritt des Metabolismus. Die Bildung von Comp6 scheint dabei nur nebengeordnet zu sein und ist zudem reversibel. Die Aktivierung von Comp6 würde ebenfalls zu Comp5 bzw. Methyl-Comp5 führen. Über die antitumorale Aktivität von Comp6 kann hier keine Aussage getroffen werden. Es ist jedoch vorstellbar, dass durch die Methylierung die Lipophilie zunimmt und so die Diffusion durch Zellmembranen erleichtert wird. Im Vergleich dazu hat die Seitenkette von Comp5, bei der es sich formal um 3-Hydroxypropansäure handelt, eine Säurekonstante von 4,5 (Windholz 1976), so dass davon auszugehen ist, dass Comp5, als deren Derivat, eine ähnlich hohe Säurekonstante aufweist. Dies bedeutet, dass bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 der

Anteil an deprotoniertem Comp5 klar überwiegt und von den Glomeruli in den Primärharn filtriert werden kann. Das leicht saure Milieu des Urins reduziert zwar den deprotonierten Anteil, der dann als ungeladenes Molekül aus dem Primärharn rückresorbiert werden kann (Herdegen et Böhm 2008), ist aber auch keine ausreichende Erklärung für die nur sehr geringe Ausscheidung. Die gleichzeitig hohen Plasmakonzentrationen legen daher die Vermutung nahe, dass Comp5 sehr stark an Plasmaproteine gebunden wird, die aufgrund ihrer Größe der glomerulären Filtration nicht zugänglich sind. Da Comp4 über dieselbe Seitenkette wie Comp5 verfügt, erklärt dies auch weshalb vergleichsweise geringe Mengen Comp4 im Urin gefunden wurden, obwohl es durch seine freie primäre Aminogruppe hydrophiler als Comp5 ist. Im Vergleich zu TriN2755 wurde für Comp5 zwar eine nahezu identische terminale Halbwertszeit gefunden, aber eine deutlich höhere durchschnittliche MRT von ca. acht Stunden. Basierend auf dem erarbeiteten Flussdiagramm sind als weitere Metabolisierungsschritte, neben der Entstehung des Methylesters, nur die Aktivierung sowie die Abspaltung der Seitenkette bekannt. Während die Aktivierung und damit die Entstehung von Comp4 bereits als langsamer Schritt identifiziert werden konnte, lässt sich über die Umwandlung zu Imp2 nur schwer eine Aussage treffen. In welchem Maß die Entstehung von Imp2 durch die Entfernung der kompletten Seitenkette von TriN2755 in nur einem Schritt abläuft bzw. ob dies überhaupt stattfindet, kann nicht beurteilt werden. Denn trotz der hohen Comp5-Konzentrationen im Plasma waren die Imp2-Plasmaspiegel so gering, dass die Quantifizierung nicht immer für alle Zeitwerte möglich war. Im Urin konnte es nahezu nicht detektiert werden. Gleichzeitig wurden wie bereits erwähnt vermeintlich große Mengen einiger der Phase-II-Metaboliten von Imp2 und dem daraus resultierenden Imp10 gefunden, die die Vermutung nahe legen, dass zuvor entsprechende Mengen Imp2 gebildet worden sein müssen. Die geringen Imp2-Spiegel liegen vermutlich in der langsamen Umwandlung von Comp5 und in einer sehr schnellen Umwandlung zum Glucuronid oder Sulfat begründet. Mit den erhobenen Daten kann diese Fragestellung allerdings nicht geklärt werden. Durch die fehlende Urinausscheidung und die verlängerte MRT muss neben dem Metabolismus aber auch eine Umverteilung von Comp5 in tiefere Gewebe bzw. ins Fettgewebe in Betracht gezogen werden. Da jedoch nicht bekannt ist welche Menge an Comp5 im Laufe des Metabolismus entsteht, können weder für Comp5 noch für die anderen Metaboliten Verteilungsvolumina berechnet werden.

Eine weitere Möglichkeit der Metabolisierung für Comp5 bzw. für alle gefundenen Carbonsäuren stellt die Glucuronidierung der Carbonsäurefunktion dar. Laut dem Übersichtsartikel von Regan et. al ist dies eine der wichtigsten Metabolisierungsreaktionen für Carbonsäure tragende Wirkstoffe (Regan et al. 2010). Dabei können die gebildeten

Glucuronidester wieder spontan zu ihrer Ausgangsverbindung hydrolisieren und unterliegen dem enterohepatischen Kreislauf. Daneben besitzen sie jedoch die Fähigkeit nicht mehr zu spaltende Isomere durch das intramolekulare Verschieben der Esterbindung zu bilden und kovalent an Proteine zu binden. Substanzen dieser Art werden aber bereits im Rahmen der Probenextraktion abgetrennt und sind für die anschließende HPLC-Analytik nicht mehr zugänglich. Im Rahmen der Auswertung konnte kein Hinweis auf das Vorliegen weiterer Glucuronide gefunden werden. Dies mag mit dem Messsystem zusammenhängen, das auf Metaboliten dieser Art nicht abgestimmt ist, aber auch mit der Tatsache, dass die Carbonsäuren und allen voran Comp5, wie bereits gezeigt, keine Endprodukte im Stoffwechsel von TriN2755 darstellen. Aus diesem Grund ist das Kumulieren von Glucuronsäureesterverbindungen unwahrscheinlich, da diese auch durch Kettenverkürzung zu Endprodukten metabolisiert werden, die keine Carbonsäurefunktion mehr enthalten.

Ein ähnliches Bild liefert Comp4, dessen durchschnittliche MRT von 7,6h Stunden mit der von Comp5 vergleichbar ist. Wie bereits erwähnt, konnte es ebenfalls nur in geringen Mengen im Urin gefunden werden. Und auch für seinen weiteren Metabolismus sind nur zwei Reaktionen bekannt. Da es aus der Aktivierung von Comp5 hervorgegangen ist, ist die verbleibende Aminogruppe nun zugänglich für die N-Acetylierung. Analog zu Comp5 kann aber auch hier die Abspaltung der Seitenkette erfolgen, die zu Imp10 führt. Wie auch schon bei Imp2 kann die Bildung von Imp10 schlecht nachverfolgt werden, denn neben geringen Konzentrationen und problematischer massensensitiver Detektion, überlagert der immer größer werdende Peak von Imp10-Sulfat die Retentionszeit von Imp10. Es ist daher wahrscheinlich, dass Imp10 aufgrund seiner geringen Größe und den zwei modifizierbaren Seitenketten direkt nach seiner Entstehung dem Phase-II-Metabolismus unterworfen wird. Zudem besteht außerdem die Möglichkeit, dass Metaboliten von Imp10 einerseits aus der Aktivierung von Imp2-Sulfat bzw. -Glucuronid und andererseits aus der Abspaltung der Seitenkette von Imp7 resultieren. Aufgrund der analogen aber dennoch unterschiedlichen Reaktionswege, die am Ende alle zu den Imp10-Derivaten führen, kann ohne Kenntnis der Geschwindigkeitskonstanten nicht beurteilt werden, welcher Weg nach der Entstehung von Comp5 bevorzugt eingeschlagen wird.

#### **4.5 Wirkung**

Da die gezeigte Aktivierung der Triazengruppe und die daraus resultierende Freisetzung von Methyldiazoniumionen bereits zu Beginn als Wirkungsmechanismus vermutet wurden, sollte dies anhand der Wirkung von TriN2755 auf die DNA intakter Zellen gezeigt werden. Neben durch die Hydrolyse freigesetztem Adenin und Guanin konnte N<sup>7</sup>-Methylguanin als einziges

Addukt detektiert werden. Bezogen auf die gemessene Guaninkonzentration war über die Dauer der Inkubation ein deutliche Zunahme des N<sup>7</sup>-MG Anteils festzustellen. Doch stellte dieser selbst nach 26 Stunden nur 1‰ der insgesamt gefundenen Guaninmenge dar. Das erwartete O<sup>6</sup>-Methylguanin konnte zu keinem der überprüften Zeitpunkte gefunden werden. Ein Vergleich monoalkylierender Substanzen von Beranek zeigte, dass der Anteil an gebildetem O<sup>6</sup>-MG bezogen auf alle entstehenden Addukte im Bereich von acht bis zu unter einem Prozent liegt (Beranek 1990). Da die Sensitivität der fluorimetrischen Detektion je nach Analyt mit ungefähr 0,1 - 1ng/ml angegeben werden kann, ist theoretisch auch der Nachweis geringer O<sup>6</sup>-MG Mengen möglich. Als nachteilig wirkten sich bei der Messung jedoch die extrem hohen Guanin- und Adeninkonzentrationen aus, deren Peakgrößen in Relation zu der eines eventuell vorhandenen Adduktes um ein Vielfaches größer waren und so die Detektion sehr kleiner Peaks erschwerten. Der Einfluss der zelleigenen Reparatur, die mit der O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase einen spezifischen Mechanismus zur Entfernung der Methylgruppe am O<sup>6</sup>-Sauerstoff des Guanins besitzt, sollte hier ebenfalls beachtet werden. Der Einfluss von MGMT auf die Wirkung von Alkylantien ist Teil vieler in vitro Untersuchungen und Studien und wird auch für Resistenzen, beispielsweise gegen Temozolomid, verantwortlich gemacht (Sarkaria et al. 2008). Berücksichtigt man die langsame Aktivierung der Triazengruppe und den geringen Anteil der Methylierungen, die auf O<sup>6</sup>-Guanin entfallen, liegt die Vermutung nahe, dass unter diesen Umständen keine detektierbaren Mengen an O<sup>6</sup>-MG entstanden sind. Was dies für die zytotoxische Wirkung von TriN2755 bedeutet, kann von den Ergebnissen dieses in vitro Versuches ausgehend jedoch nicht beurteilt werden, zumal in den präklinischen Tierversuchen Tumorregression gezeigt werden konnte. Da die für die diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass neben TriN2755 auch andere Triazene in nennenswerten Konzentrationen im Plasma der Patienten zu finden sind, muss auch bei diesen Verbindungen mit einem zytotoxischen Potenzial gerechnet werden. Deren Charakterisierung als Zytostatika im Vergleich zu TriN2755 sowie dessen klinische Wirkung in der durchgeführten Studie werden im Rahmen zweier weiterer Arbeiten ausgeführt, weshalb in dieser Arbeit nicht weiter auf die beiden genannten Punkte eingegangen wird.

#### **4.6 Flussdiagramm**

Während in der ursprünglichen Version des Flussdiagramms nur die bekannten Referenzsubstanzen dargestellt sind, enthält die überarbeitete Version zusätzlich alle gefundenen neuen Metaboliten und erklärt in welchem Zusammenhang zwei benachbarte Verbindungen zueinander stehen, auch wenn diese zum Teil nur theoretischer Natur sind, da

vor allem im späteren Verlauf des Metabolismus verschiedene Wege zu einem einzelnen Phase-II-Metaboliten führen und sich über die reine Bestimmung der Spiegel keine Aussage über bevorzugte Bildungswege bzw. tendenziell schnellere oder langsamere Umsetzungen treffen lässt. Im direkten Vergleich des jetzt bekannten Schemas mit der Prognose von TriN Pharma kann aber klar gesagt werden, dass Imp4 keinesfalls einer der Hauptmetaboliten von TriN2755 ist. Wie bereits geschildert, konnten dessen phenolische Abbauprodukte, mit der Ausnahme von Imp10, zu keiner Zeit in den Proben der Patienten gefunden werden. Da sie im in vitro Versuch bei niedrigen pH-Wert durch Hydrolyse zugänglich sind und trotz der hohen Comp5-Konzentration im Blut auch kein Imp1 zu sehen war, ist die Prognose an dieser Stelle nicht zutreffend. Comp5 hingegen wurde nur eine untergeordnete Rolle eingeräumt, obwohl es sich als Hauptmetabolit von TriN2755 darstellt, die Spiegel von TriN2755 teilweise sogar übersteigt und in Abhängigkeit von der Dosis bis zum letzten Zeitpunkt der Probennahme detektiert werden kann. Auch wenn ein Großteil von TriN2755 in Comp5 umgewandelt wird, wird vermutlich nur ein sehr geringer Anteil direkt als Comp5 eliminiert, da es nicht über den Urin ausgeschieden wird und der Metabolismus auf dieser Stufe nicht stehen bleibt. Inwieweit dies in den für Comp5 prognostizierten prozentualen Anteil mit eingeflossen ist, ist nicht bekannt. Stattdessen geht TriN Pharma von Imp3 als zweiten Hauptmetaboliten aus. Diese Annahme kann aufgrund der Messergebnisse ebenfalls nicht bestätigt werden. Auch das durch die N-Acetylierung von Imp3 entstehende Imp8 lag nur in sehr niedriger Konzentration vor, so dass ein schnelles Abreagieren von Imp3 über diesen Weg nicht sehr plausibel erscheint. Die Kettenverkürzung von Imp3 führt aber auch zur Entstehung von Comp4, was im ursprünglichen Flussdiagramm außer Acht gelassen wurde. Comp4 liegt nach TriN2755 und Comp5 in verhältnismäßig hohen Konzentrationen im Blut vor. Da es neben Imp3 auch mit Comp5 in direktem Zusammenhang steht, ist aufgrund der sehr hohen Comp5-Konzentration jedoch davon auszugehen, dass ein Großteil des gefundenen Comp4 aus Comp5 hervorgegangen ist, so dass die Prognose auch an dieser Stelle nicht zutreffend ist. Im Gegensatz dazu trifft die Aussage, dass nur wenig Imp2 und Imp10 zu erwarten seien, in gewisser Weise zu. Die Konzentrationen dieser Metaboliten waren so niedrig, dass sie teilweise nicht mehr quantifiziert werden konnten oder durch Überlagerung anderer Metaboliten nicht mehr detektierbar waren. Dass dies aus dem extensiven Phase-II-Metabolismus von Imp2 und Imp10 resultiert, wird hingegen nicht aus der Prognose sichtbar. Wie bereits dargestellt, entstehen hierbei besonders große Mengen Imp2- und Imp10-Sulfat, entsprechende Glucuronide und im Falle von Imp10 zusätzlich N-Acetylderivate.

Da all diese Prozesse bereits kurz nach dem Start der TriN2755-Infusion nebeneinander ablaufen, zu verschiedenen Zeitpunkten aber unterschiedlich stark ins Gewicht fallen und



außerdem große Schwankungen beim Vergleich der Patienten untereinander festgestellt wurden, können für die Metaboliten im überarbeiteten Flussdiagramm keine Mengenangaben in prozentualer Form gemacht werden. Wie bereits geschildert, können zudem noch weitere denkbare Metaboliten existieren und auch der Einfluss und die Bedeutung der Methylester ist weiterhin ungeklärt.

## **5 Fazit/Ausblick**

Bei TriN2755 handelt es sich um eine Substanz, die in vivo einem ausgeprägtem Metabolismus unterliegt. Nach Verabreichung von TriN2755 konnten seit Beginn der Humanstudie bis jetzt 20 strukturell ähnliche Metaboliten gefunden werden und es ist nicht ausgeschlossen, dass noch Weitere existieren. Zusätzlich sind fünf weitere Abbauprodukte bekannt, die jedoch nur im in vitro Versuch zugänglich sind. Neben dem Metabolismus erfolgt die Ausscheidung in unveränderter Form, die von 3,5% bis hin zu 35% der verabreichten Dosis reicht. Im Phase-I-Metabolismus von TriN2755 scheint Comp5 eine sehr wichtige Rolle zu spielen. Bei allen behandelten Patienten konnte Comp5 in großer Menge gefunden werden und überstieg teilweise sogar die Spiegel von TriN2755. Da erst von Comp5 ausgehend die Aktivierung der Triazengruppe in größerem Umfang stattfindet, wie sich an den Imp3- und Comp4-Spiegeln zeigt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei TriN2755 um ein Prodrug handelt, dessen Wirkform Comp5 ist. Betrachtet man die breit gefächerte Metabolisierung und die große Spannweite der renalen Ausscheidung, scheint sich hieraus jedoch kein Vorteil zu ergeben. So können für Wirkung wie auch Nebenwirkungen neben TriN2755 bzw. Comp5 durchaus auch andere der entstehenden Metaboliten verantwortlich sein. Die Zuordnung im Sinne einer klar definierten pharmakodynamischen Beschreibung scheint bei der Vielzahl der gefundenen Metaboliten nahezu unmöglich. Es sollte daher untersucht werden, ob es sich bei Comp5 nicht auch um einen Kandidaten für die klinische Prüfung handelt. Dies hätte den Vorteil, dass neben TriN2755 selbst auch fünf weitere bekannte Metaboliten im Flussdiagramm außer Acht gelassen werden könnten. Außerdem ist aus den Untersuchungen bekannt, dass Comp5 in den gefundenen Konzentrationen nicht renal ausgeschieden wird. Dosis-Wirkungs-Beziehungen für Comp5 sollten sich daher leichter herstellen lassen, auch wenn dann die Gefahr der Akkumulierung berücksichtigt werden muss. Mit hohen Konzentrationen sulfatierter Metaboliten, die dann primär mit dem Urin ausgeschieden werden, ist aber auch in diesem Fall wieder zu rechnen. Ebenfalls überdacht werden sollte die Art der Applikation sowie deren Dauer. Die kontinuierliche Gabe über 4 Stunden führt am Ende der Infusion zu hohen Spitzenspiegeln, die aber aufgrund der kurzen Halbwertszeit innerhalb eines Tages wieder abfallen. Um länger anhaltende

Wirkstoffkonzentrationen im Blut zu erreichen, müsste entweder die Frequenz der Infusionen erhöht oder die Infusionszeit verlängert werden. Mit Hinblick auf die Compliance der Patienten bei einer solchen Therapie sollte die Möglichkeit TriN2755 oder gar Comp5 in oraler Form zu verabreichen näher untersucht werden, auch wenn in diesem Fall die Säurelabilität der Triazene beachtet werden muss. Ob dies zu einem potenten Arzneimittel führt, dass sich mit bereits etablierten Substanzen messen kann, müssen dann weitere Studien zeigen.

## 6 Zusammenfassung

Bei TriN2755 handelt es sich um ein neues Triazen. Wie andere Vertreter dieser Substanzklasse ist es in der Lage einzelne DNA-Basen zu methylieren und über diesen Weg Apoptose zu induzieren. Da bisher noch keine Daten über die Verabreichung an menschlichen Patienten existierten, wurde zur Untersuchung der Sicherheit und Verträglichkeit eine Phase-I-Studie mit 38 Patienten durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Pharmakokinetik von TriN2755 zu beschreiben und den aufgrund der präklinischen Untersuchungen erwarteten Metabolismus, von dem bereits TriN2755 und neun weitere Verbindungen bekannt waren, zu verifizieren. Zu diesem Zweck wurde eine Methode zur Aufreinigung der Plasma- und Urinproben und eine sich daran anschließende HPLC-Analytik entwickelt und validiert. Die Detektion erfolgte simultan mit einem Photo-Dioden-Array und einem Massenspektrometer, das die Quantifizierung im einstelligen Nanogrammbereich ermöglichte. Bei einer initialen in vitro Inkubation von humanen Leukozyten eines gesunden Spenders mit TriN2755 wurden entstehende DNA-Addukte nach thermischer Hydrolyse ebenfalls per HPLC getrennt und fluorimetrisch detektiert. Außer einem mit der Zeit zunehmenden N<sup>7</sup>-Methylguaninanteil, konnten keine weiteren Addukte nachgewiesen werden. Die Untersuchung der dabei entstandenen Metaboliten lieferte vor allem Comp5 und Imp7 und deutete gleichzeitig auf die langsame Umsetzung der Triazene zu ihren inaktiven Abbauprodukten hin, da auch am Ende der Inkubation noch große Mengen TriN2755 vorhanden waren.

Die an der Studie teilnehmenden Patienten erhielten TriN2755 als vierstündige Dauerinfusion. Die absolute Dosis wurde im Verlauf der Studie von 25mg auf 6000mg TriN2755 angehoben. Über einen Zeitraum von 26 Stunden nach Infusionsstart wurden pro Patient 14 Plasmaproben und alle in dieser Zeit anfallenden Urinproben gesammelt. Im Rahmen der durchgeführten Studie wurden so insgesamt 514 Plasmaproben sowie 352 Urinproben analysiert. Als Hauptmetaboliten des Phase-I-Metabolismus wurden Comp5 und Comp4 identifiziert. Aus den Messdaten wurden für TriN2755, Comp5 und Comp4 alle zugänglichen pharmakokinetischen Parameter berechnet. Ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Geschlecht der Patienten und den berechneten Maximalkonzentrationen sowie den Flächen unter den Kurven konnte nicht bestätigt werden. Bei der Verabreichung von mehr als 800mg TriN2755 konnte ein Wechsel von linearer zu nicht-linearer Pharmakokinetik gezeigt werden.

Im Zuge der Auswertung wurden über den Vergleich von unbekannten Absorptions- und Massenspektren mit denen der Referenzsubstanzen weitere Metaboliten identifiziert. Das

bereits bekannte Schema zum Metabolismus von TriN2755 konnte so von 10 auf insgesamt 26 Verbindungen erweitert werden. Insbesondere wurden viele Phase-II-Metaboliten entdeckt, bei denen es sich um teils N-acetylierte Sulfate und Glucuronide der bereits bekannten Metaboliten Imp2 und Imp10, handelte. Der Metabolismus sowie die Pharmakokinetik von TriN2755 sind damit weit komplexer als ursprünglich vermutet. Einige der Metaboliten verfügen noch immer über die Triazenfunktion, unterliegen aber insgesamt sehr viel weniger metabolischen Umwandlungen als TriN2755 selbst. In weiteren Untersuchungen sollte daher geklärt werden, ob es sich bei diesen Substanzen um potenzielle klinische Kandidaten handelt, die in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften TriN2755 sogar überlegen sind.

## 7 Summary

TriN2755 is a novel triazene. Like other agents of this substance class it has the ability to methylate DNA bases which leads to apoptosis. Since there was no data concerning the administration to human subjects, a Phase I clinical trial with 38 subjects was conducted which should assess safety and tolerance to TriN2755.

The aim of this present work was to investigate the pharmacokinetics of TriN2755. Based on results of the preclinical research, a flow chart for TriN2755 and its already known metabolites was created which had to be verified. For this purpose a method to clean up plasma and urine samples was established. Subsequent HPLC analytics using both photodiode array and mass spectrometric detection with sensitivity in the range of nanograms was set up and validated. A preceding in vitro incubation of human leukocytes from a healthy donor with TriN2755 was performed to analyse formed DNA adducts. Following thermal hydrolysis DNA adducts were analysed using HPLC with fluorometric detection. Continuous incubation led to rising N<sup>7</sup>-methylguanine levels but no other adduct could be detected. Analysis of metabolites that were formed during incubation yielded primarily Comp5 and Imp7 and implied slow conversion of triazenes to their inactive decomposition products as high concentrations of TriN2755 remained at the end of incubation period.

Throughout the trial, the absolute dose of TriN2755 was increased from 25mg to 6000mg. Following the start of infusion 14 plasma samples and every urine sample were collected in a 26 hour time window. 514 plasma samples and 352 urine samples were collected and analysed this way. Comp5 and Comp4 were identified to be the primary metabolites during Phase I metabolism. Measured data was then used to calculate all accessible pharmacokinetic parameters. No statistical connection between the subjects' gender and calculated maximum concentrations or areas under the curve could be found. After administration of more than 800mg TriN2755 a change in pharmacokinetics from linear to non-linear was shown.

New metabolites were identified by comparing absorption and mass spectra of unidentified peaks with reference data. The original flow chart that covered TriN2755 and 9 of its metabolites was expanded to 26 compounds in total. Notably a lot of Phase II metabolites which turned out to be derivatives of Imp10 and Imp2 were found. These were either sulfate or glucuronide conjugates that additionally could be N-acetylated. Metabolism and pharmacokinetics of TriN2755 seemed to be far more complex than expected. Some of these metabolites still bear a triazene moiety but were not metabolized that excessiv. Further investigations should therefore examine if one of these metabolites can also become a clinical candidate which might be even superior to TriN2755.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Ackermann S et al., *Onkologische Therapie: Behandlung von Leukämien, Lymphomen und soliden Tumoren*, 1. Auflage, Schattauer, Stuttgart [u.a.] 2004.
2. Aktories K et al., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 10. Auflage, Elsevier, Urban & Fischer, München 2009.
3. Beranek DT, *Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents*, *Mutat. Res.* 1990, 231 (1), 11–30.
4. Black M, *Acetaminophen Hepatotoxicity*, *Annu. Rev. Med.* 1984, 35 (1), 577–593.
5. Bryson PD, *Comprehensive review in toxicology for emergency clinicians*, 3. Auflage, Taylor & Francis, Washington, DC 1996.
6. Cappiello M, Franchi M, Giuliani L, Pacifici GM, *Distribution of 2-naphthol sulphotransferase and its endogenous substrate adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulphate in human tissues*, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1989, 37 (3), 317–320.
7. Carvalho E, Francisco AP, Iley J, Rosa E, *Triazene drug metabolites. Part 17: synthesis and plasma hydrolysis of acyloxymethyl carbamate derivatives of antitumour triazenes*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2000, 8 (7), 1719–1725.
8. Clarke S, *Protein methylation*, *Current Opinion in Cell Biology* 1993, 5 (6), 977–983.
9. Darkes MJ, Plosker GL, Jarvis B, *Temozolomide*, *American Journal of Cancer* 2002, 1 (1), 55–80.
10. European Medicines Agency, *Humand medicines*, [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/landing/human\\_medicines\\_regulatory.jsp](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/landing/human_medicines_regulatory.jsp) 2012.
11. FIZ Chemie, *CHEMGAROO® Educational Systems*, [www.chemgapedia.de](http://www.chemgapedia.de) 2012.
12. Furukawa M et al., *Cytochrome P450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver*, *Cancer Science* 2004, 95 (6), 520–529.
13. Gunaratna C, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics in Drug Discovery: A Primer For Bioanalytical Chemists, Part II*, <http://www.currentseparations.com/issues/19-3/index.html> 2001.
14. Heinzl G et al., *TopFit, version 2.0: Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis system for the PC*, G. Fischer VCH Publishers, Stuttgart, New York 1993.
15. Herdegen T, Böhm R, *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*, Thieme, Stuttgart [u.a.] 2008.
16. Hoeijmakers JHJ, *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer*, *Nature* 2001, 411 (6835), 366–374.

17. Houston JB, Taylor G, *Drug metabolite concentration-time profiles: influence of route of drug administration*, Br J Clin Pharmacol 1984, 17 (4), 385–394.
18. Huisgen R, Koch H, *Die Kupplung aromatischer mit aliphatischen Diazoverbindungen*, Justus Liebigs Ann. Chem. 1955, 591 (2), 200–231.
19. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *ICH Guidelines*, <http://www.ich.org/products/guidelines.html> 2012.
20. Klaassen CD, Boles JW, *Sulfation and sulfotransferases 5: the importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation*, FASEB J. 1997, 11 (6), 404–418.
21. Knights KM, Sykes MJ, Miners JO, *Amino acid conjugation: contribution to the metabolism and toxicity of xenobiotic carboxylic acids*, Expert Opin Drug Metab Toxicol 2007, 3 (2), 159–168.
22. Langguth P, *Biopharmazie*, Wiley-VCH, Weinheim 2004.
23. Long L, Dolan ME, *Role of Cytochrome P450 Isoenzymes in Metabolism of O6-Benzylguanine: Implications for Dacarbazine Activation*, Clinical Cancer Research 2001, 7, 4239–4244.
24. Marchesi F et al., *Triazene compounds: Mechanism of action and related DNA repair systems* 2007, 56 (4), 275–287.
25. Massi P et al., *Intestinal effect of morphine 6-glucuronide: in vivo and in vitro characterization*, European Journal of Pharmacology 1994, 253 (3), 269–274.
26. Mulder GJ, *Conjugation Reactions In Drug Metabolism: An Integrated Approach*, CRC Press, London 1990.
27. Mutschler E et al., *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 9. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2008.
28. Orfanos CE et al., *Therapie der Hautkrankheiten*, 2. Auflage, Springer, Berlin [u.a.] 2002.
29. Paik WK, Lee HW, Kim S, *Non-enzymatic methylation of proteins with S-adenosyl-L-methionine*, FEBS Letters 1975, 58 (1-2), 39–42.
30. Paine MF, *THE HUMAN INTESTINAL CYTOCHROME P450 "PIE"*, Drug Metabolism and Disposition 2006, 34 (5), 880–886.
31. Redlich G et al., *Distinction between Human Cytochrome P450 (CYP) Isoforms and Identification of New Phosphorylation Sites by Mass Spectrometry*, J. Proteome Res. 2008, 7 (11), 4678–4688.

32. Regan SL et al., *Acyl glucuronides: the good, the bad and the ugly*, Biopharm. Drug Dispos. 2010, 31 (7), 367–395.
33. Reid JM et al., *Metabolic activation of dacarbazine by human cytochromes P450: the role of CYP1A1, CYP1A2, and CYP2E1*, Clin. Cancer Res. 1999, 5 (8), 2192–2197.
34. Rooseboom M, Commandeur JNM, Vermeulen NPE, *Enzyme-Catalyzed Activation of Anticancer Prodrugs*, Pharmacological Reviews 2004, 56 (1), 53–102.
35. Ross MK, Crow JA, *Human carboxylesterases and their role in xenobiotic and endobiotic metabolism*, J. Biochem. Mol. Toxicol 2007, 21 (4), 187–196.
36. Rydberg B, Lindahl T, *Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction*, The EMBO Journal 1982, 1 (2), 211–216.
37. Sabbioni G, Jones CR, *Biomonitoring of arylamines and nitroarenes*, Biomarkers 2002, 7 (5), 347–421.
38. Sarkaria JN et al., *Mechanisms of Chemoresistance to Alkylating Agents in Malignant Glioma*, Clinical Cancer Research 2008, 14 (10), 2900–2908.
39. Shah VP et al., *Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies*, Pharmaceutical Research 1992, 09 (4), 588–592.
40. Shrivastav N, Li D, Essigmann JM, *Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation*, Carcinogenesis 2010, 31 (1), 59–70.
41. Smith RH et al., *The methyldiazonium ion in water: competition between hydrolysis and proton exchange*, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1985 (14), 936.
42. The Scripps Research Institute, *BioGPS*, <http://biogps.org> 2013.
43. Thust R, Schneider M, Wagner U, Schreiber D, *Structure/activity investigations in eight arylalkyltriazenes comparison of chemical stability, mode of decomposition, and SCE induction in Chinese hamster V79-E cells*, Cell Biol. Toxicol. 1991, 7 (2), 145–165.
44. Tukey RH, Strassburg CP, *Human UDP-Glucuronosyltransferases: Metabolism, Expression, and Disease*, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2000, 40 (1), 581–616.
45. U.S. Food and Drug Administration, *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf> 2001.
46. U.S. Food and Drug Administration, *Guidance, Compliance, & Regulatory Information*, <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/default.htm> 2012.
47. U.S. National Library of Medicine, *ClinicalTrials.gov*, <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01259518> 2013.



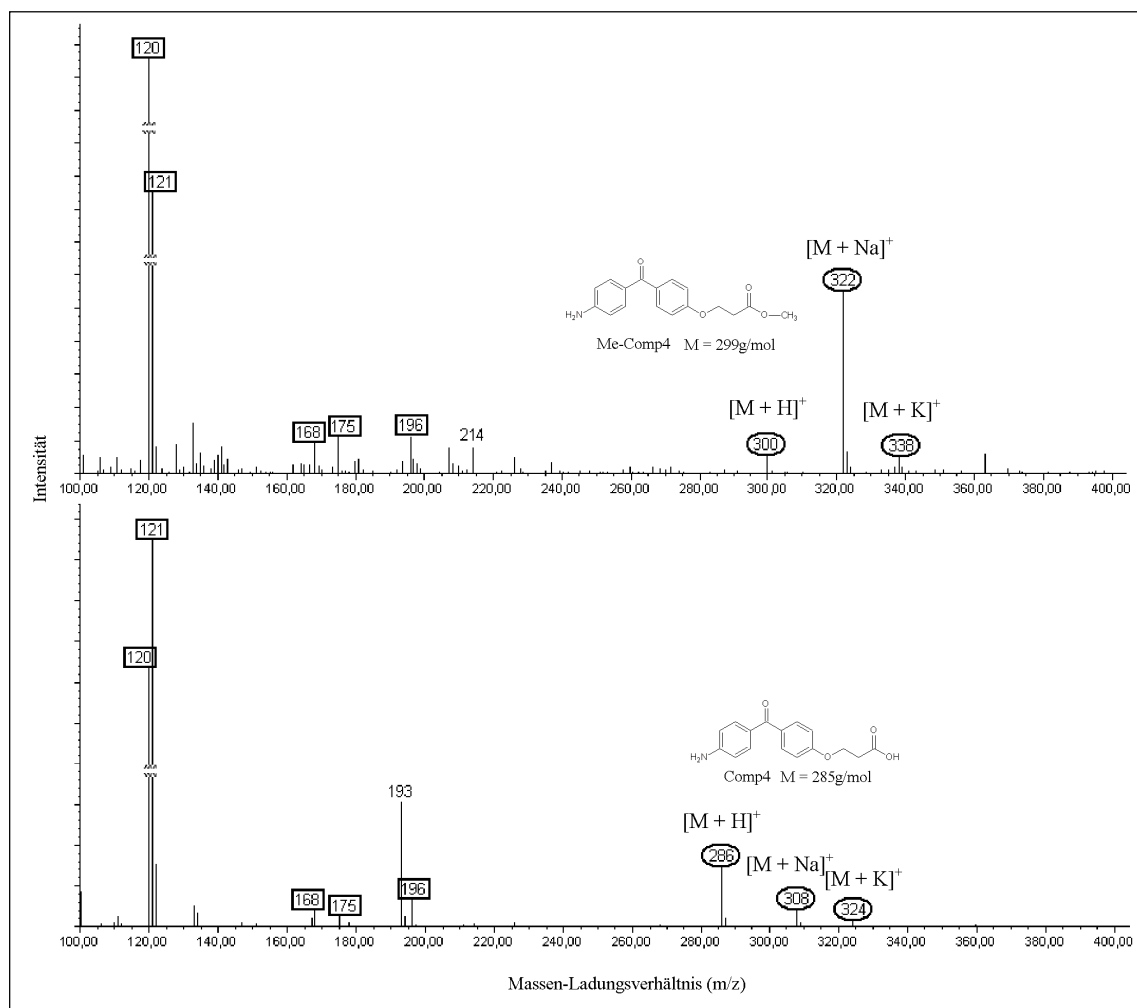
48. Windholz M, *The Merck index: An encyclopedia of chemicals and drugs*, 9. Auflage, Merck, Rahway, N.J 1976.
49. World Health Organisation, *Fact sheet N°297 Cancer*,  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> 2012.

## 9 Anhang

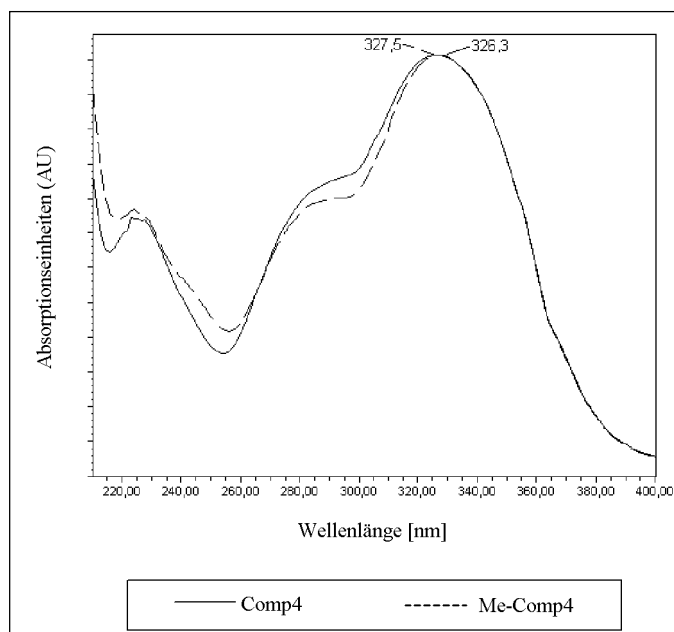
### 9.1 Identifizierung neuer Metaboliten

#### 9.1.1 Methylverbindungen

##### 9.1.1.1 Methyl-Comp4

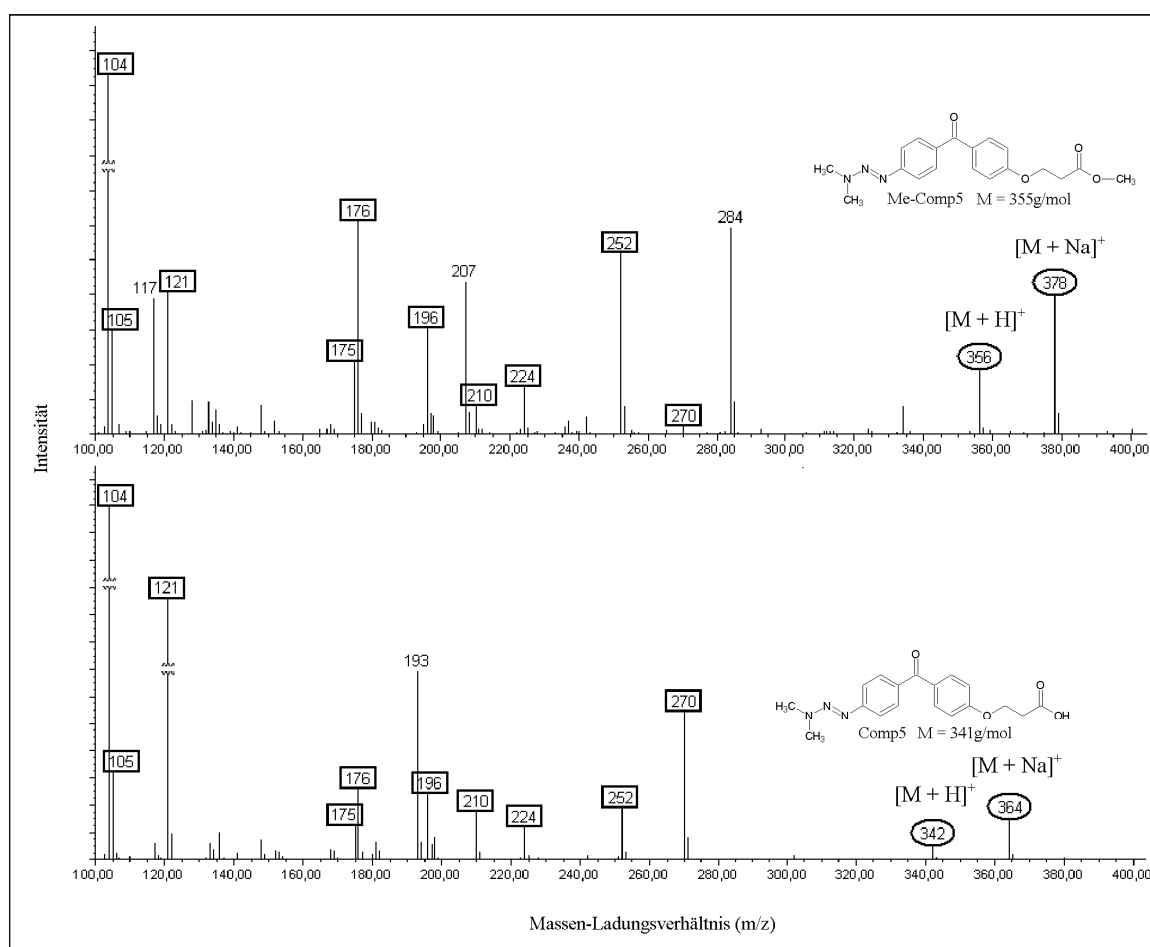


**Abb. 56** Oben: Massenspektrum von Plasma von Patient #01-09, 15min nach Ende der Infusion, Retentionszeit 11min. Unten: Massenspektrum von Comp4 in wässriger Lösung mit einer Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$

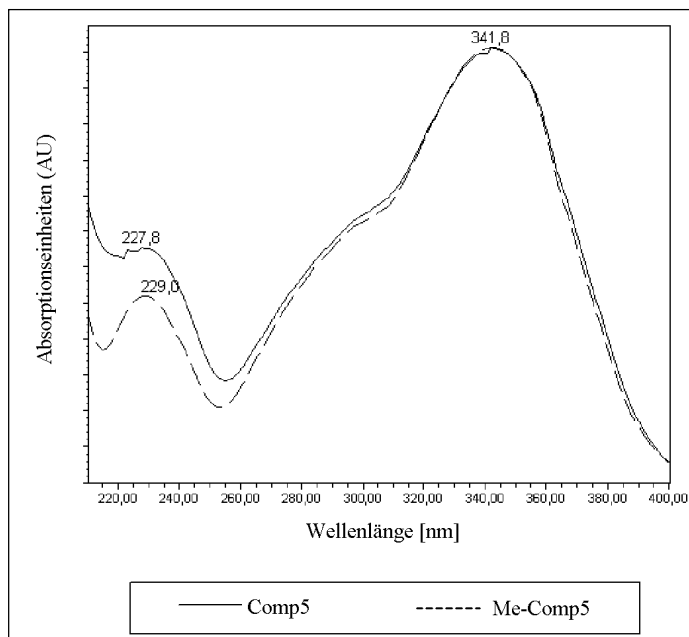


**Abb. 57 Vergleich der Absorptionsspektren von Comp4 und Me-Comp4 im Plasma von Patient #01-42, 5min nach Ende der Infusion**

### 9.1.1.2 Methyl-Comp5

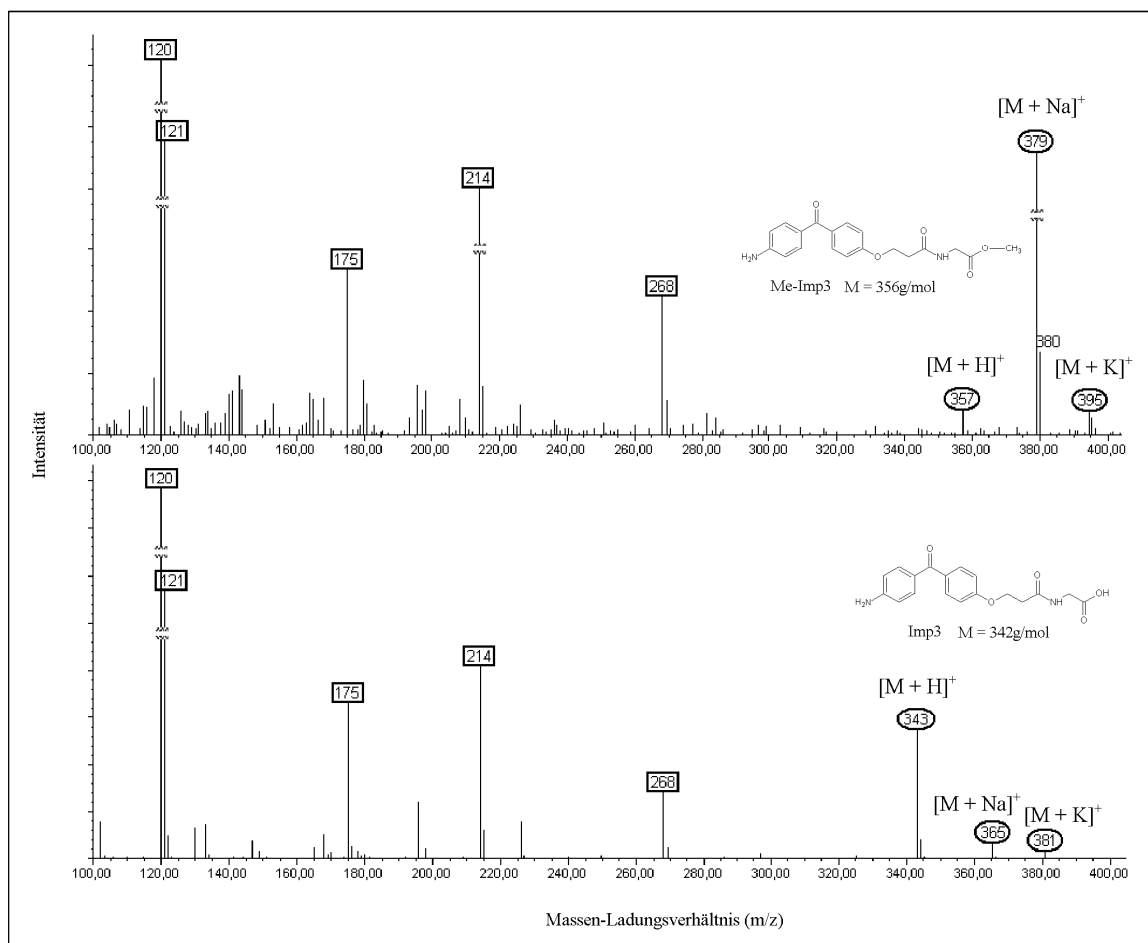


**Abb. 58 Oben: Massenspektrum von Plasma von Patient #01-09, 15min nach Ende der Infusion, Retentionszeit 30,3min. Unten: Massenspektrum von Comp5 in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 1µg/ml**

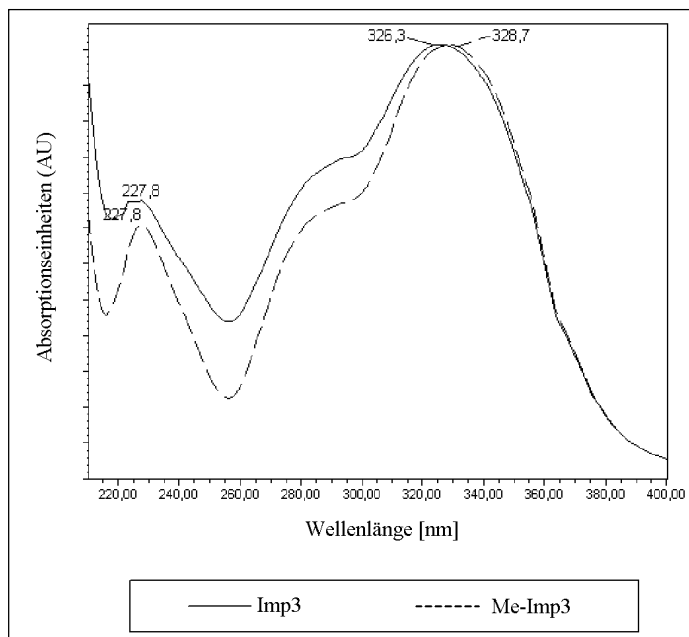


**Abb. 59** Vergleich der Absorptionsspektren von Comp5 und Me-Comp5 im Plasma von Patient #01-42, 5min nach Ende der Infusion

### 9.1.1.3 Methyl-Imp3

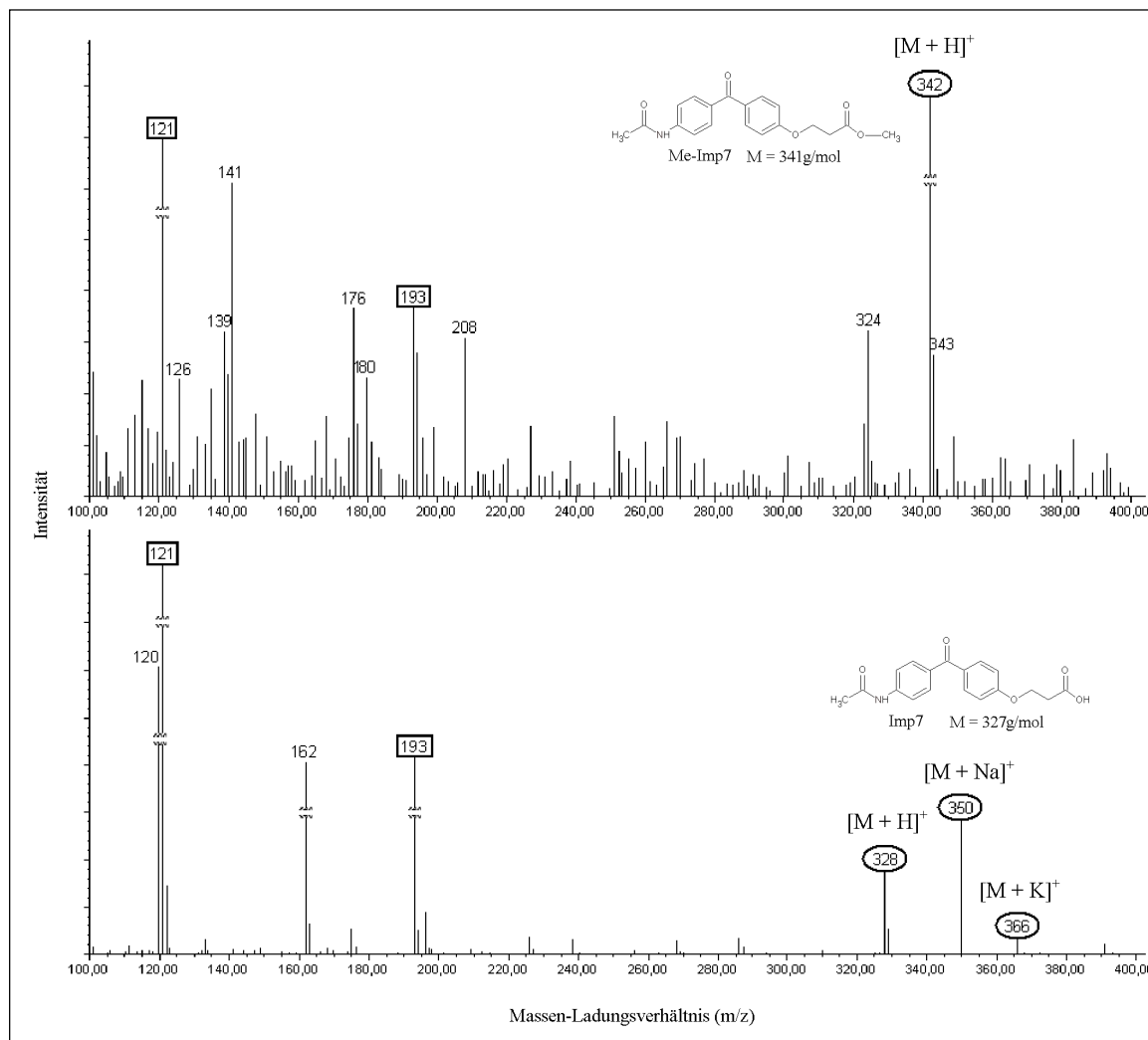


**Abb. 60** Oben: Massenspektrum von Plasma von Patient #01-09, 15min nach Ende der Infusion, Retentionszeit 9,6min. Unten: Massenspektrum von Imp3 in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 1µg/ml

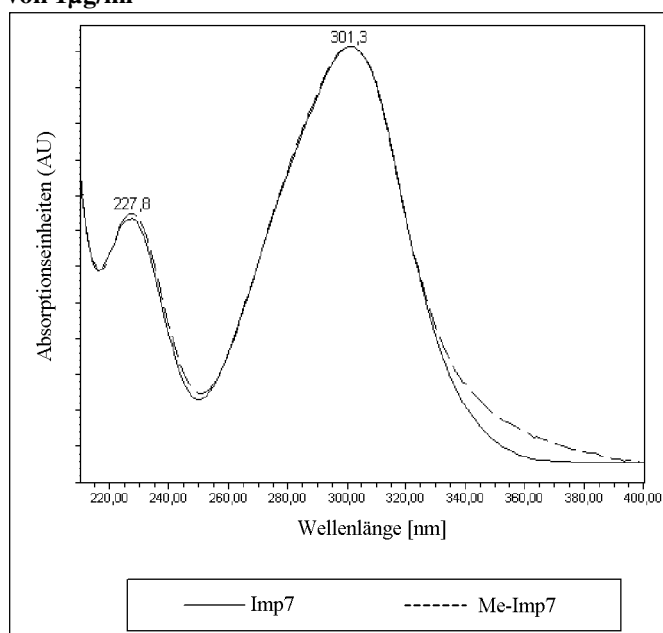


**Abb. 61 Vergleich der Absorptionsspektren von Imp3 und Me-Imp3 im Plasma von Patient #01-42, 5min nach Ende der Infusion**

### 9.1.1.4 Methyl-Imp7

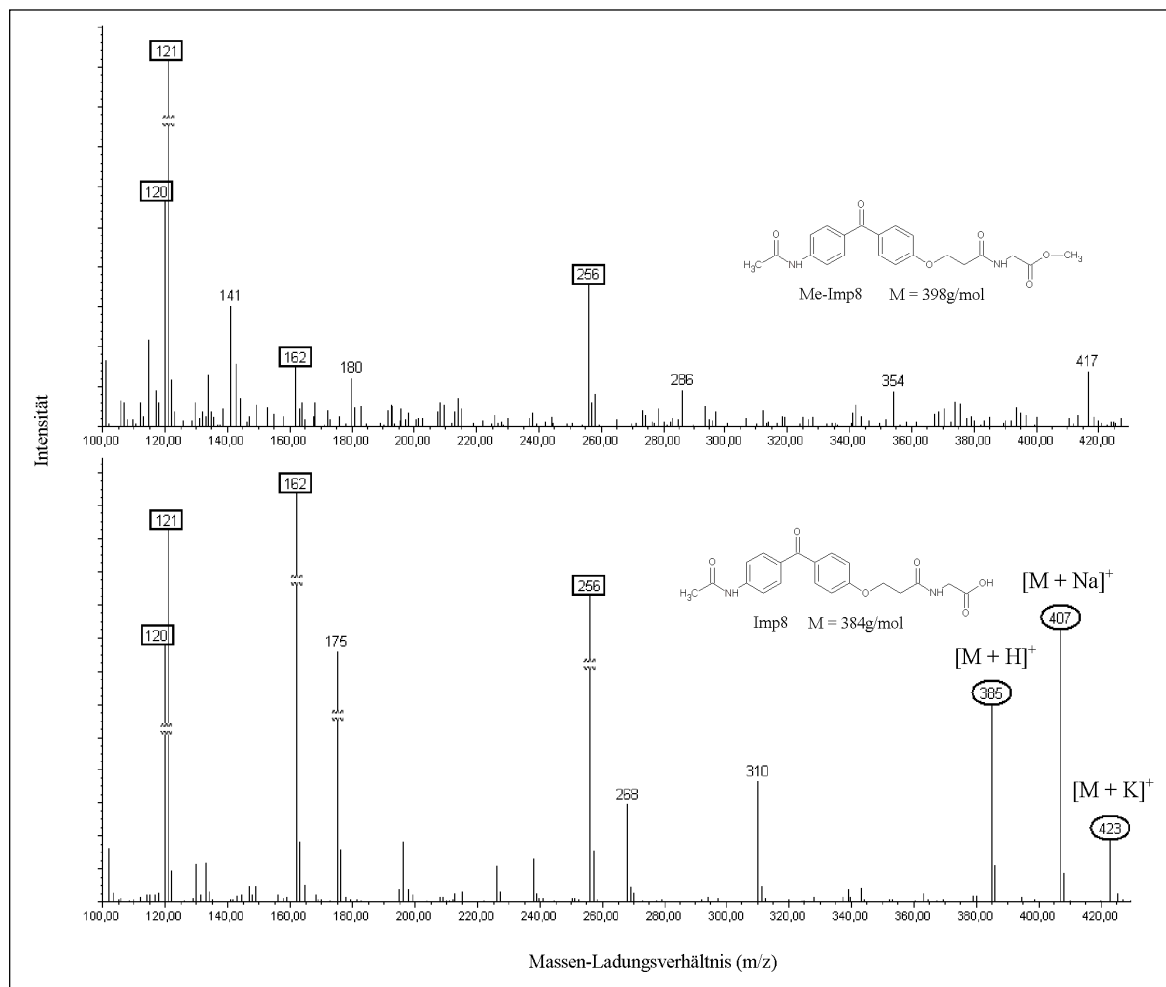


**Abb. 62** Oben: Massenspektrum von Plasma von Patient #01-09, 15min nach Ende der Infusion, Retentionszeit 25,3min. Unten: Massenspektrum von Imp7 in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 1µg/ml

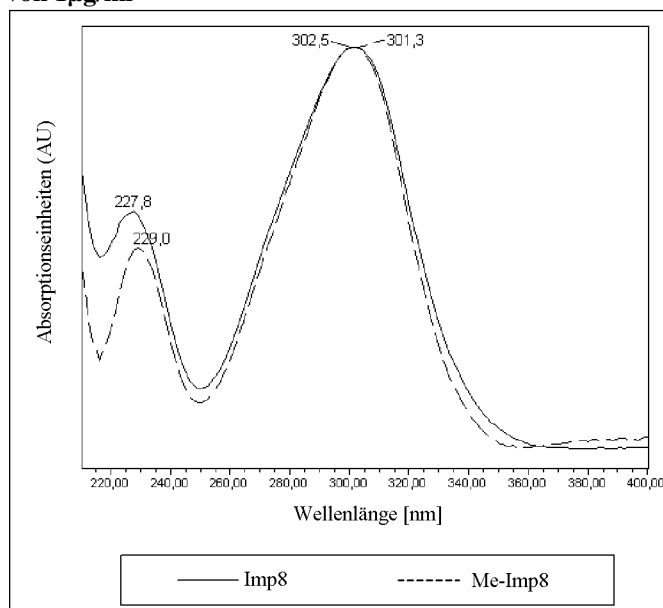


**Abb. 63** Vergleich der Absorptionsspektren von Imp7 und Me-Imp7 im Plasma von Patient #01-42, 5min nach Ende der Infusion

### 9.1.1.5 Methyl-Imp8



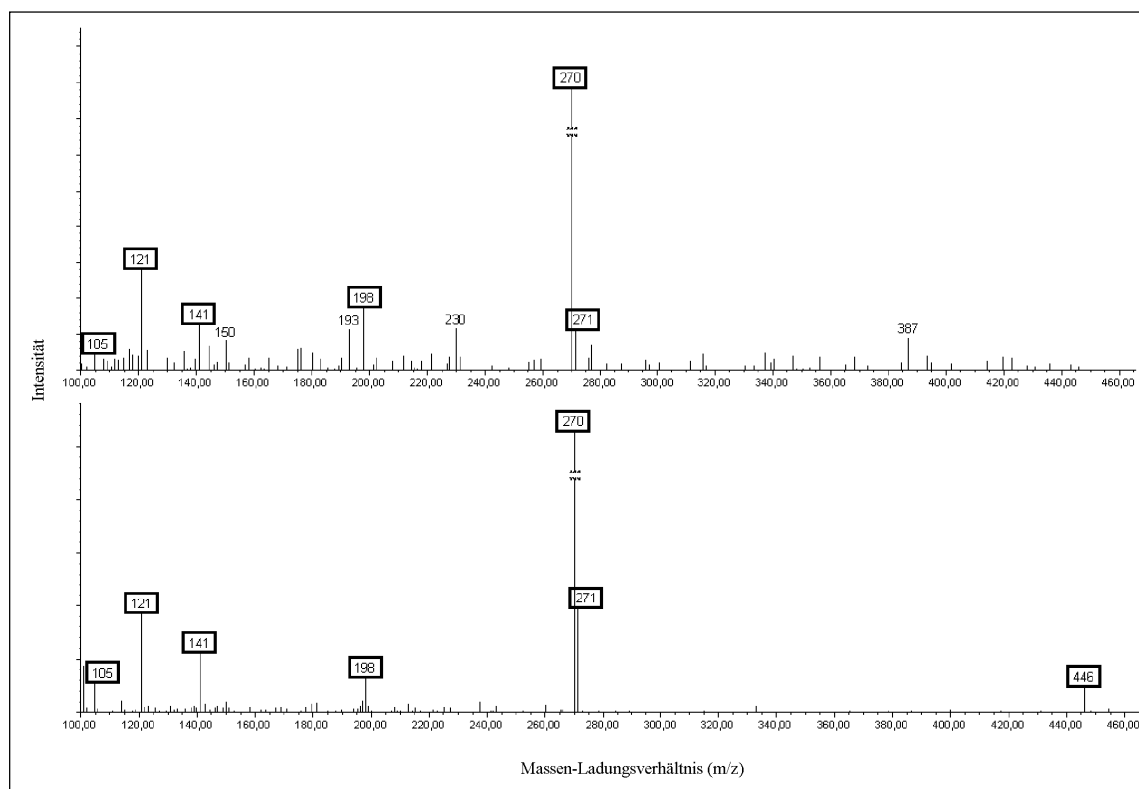
**Abb. 64** Oben: Massenspektrum von Plasma von Patient #01-09, 15min nach Ende der Infusion, Retentionszeit 11,6min. Unten: Massenspektrum von Imp8 in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 1µg/ml



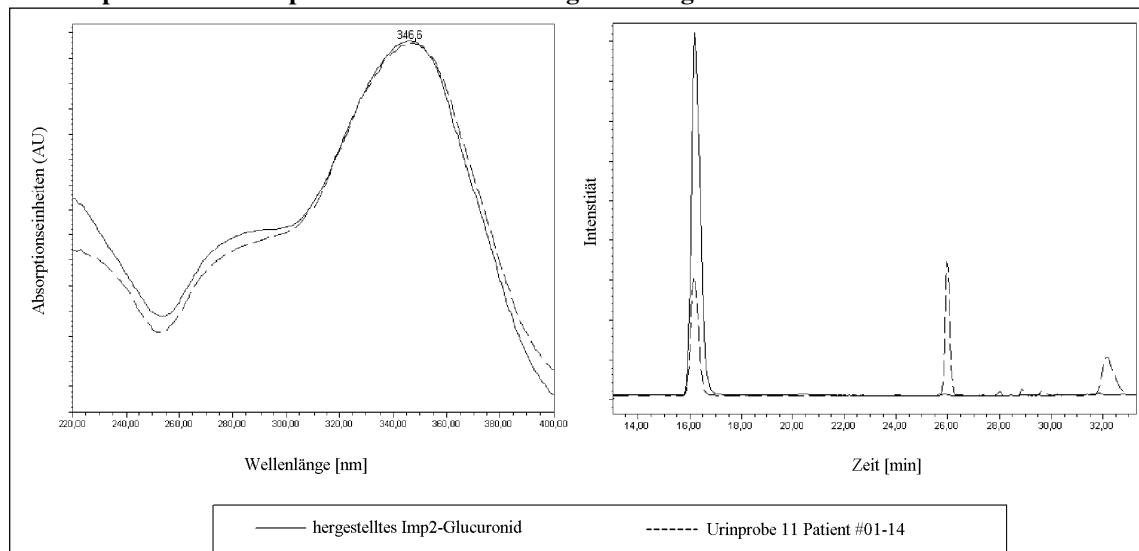
**Abb. 65** Vergleich der Absorptionsspektren von Imp8 und Me-Imp8 im Plasma von Patient #01-42, 5min nach Ende der Infusion

## 9.1.2 Metaboliten von Imp2

### 9.1.2.1 Imp2-Glucuronid



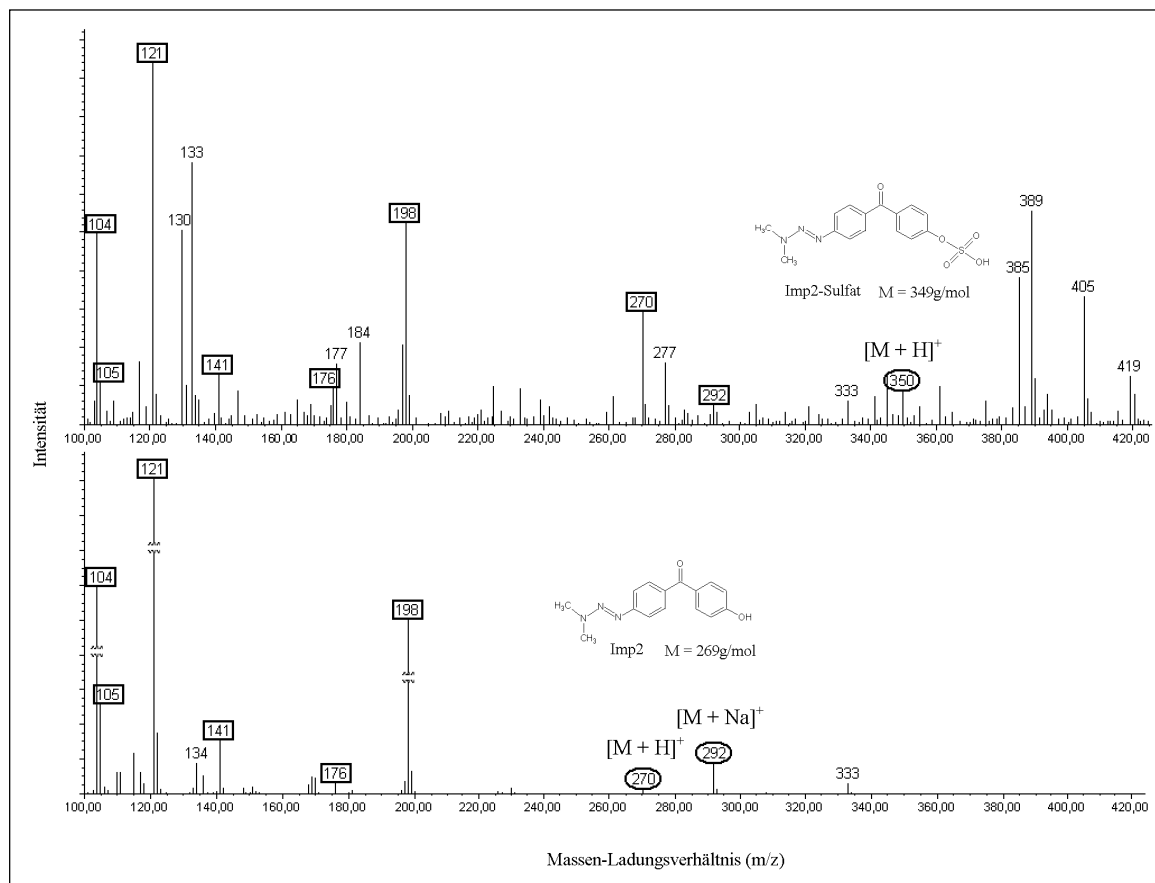
**Abb. 66** Oben: Massenspektrum von Urin von Patient #01-14, Retentionszeit 16,2min. Unten: Massenspektrum von Imp2-Glucuronid in wässriger Lösung



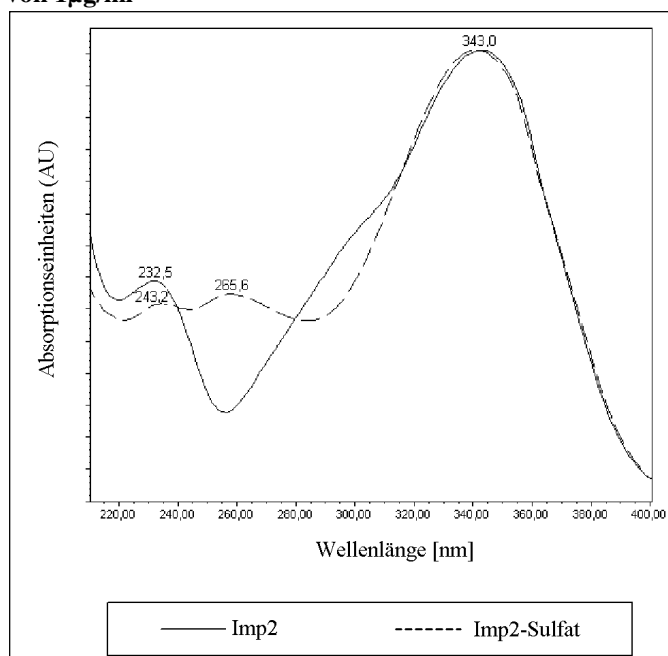
**Abb. 67** Links: Vergleich der Absorptionsspektren des gefundenen Peaks und hergestelltem Imp2-Glucuronid, Rechts: Vergleich der Retentionszeiten der Peaks im SIR270



### 9.1.2.2 Imp2-Sulfat



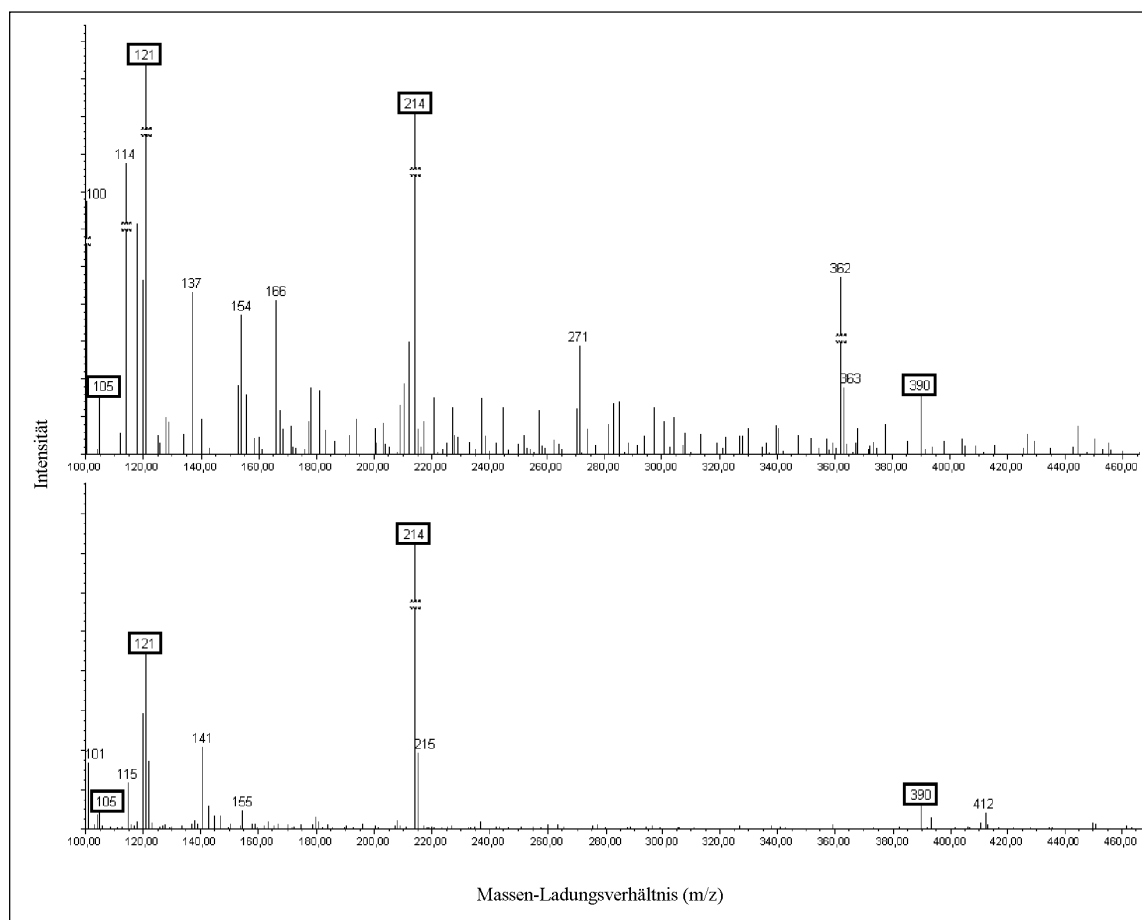
**Abb. 68** Oben: Massenspektrum von Plasma von Patient #01-09, 15min nach Ende der Infusion, Retentionszeit 32,7min. Unten: Massenspektrum von Imp2 in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 1µg/ml



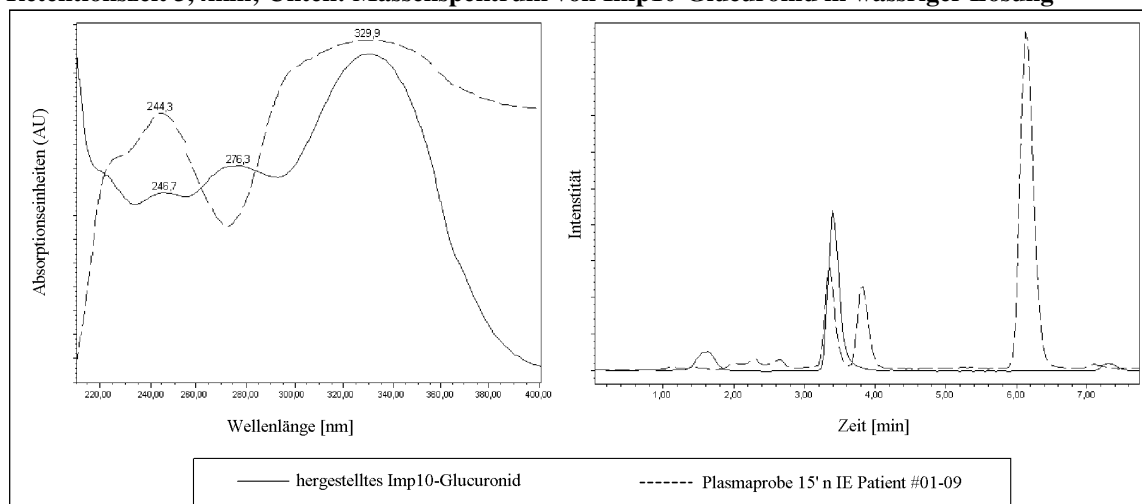
**Abb. 69** Vergleich der Absorptionsspektren des gefundenen Peaks und Imp2

### 9.1.3 Metaboliten von Imp10

#### 9.1.3.1 Imp10-Glucuronid

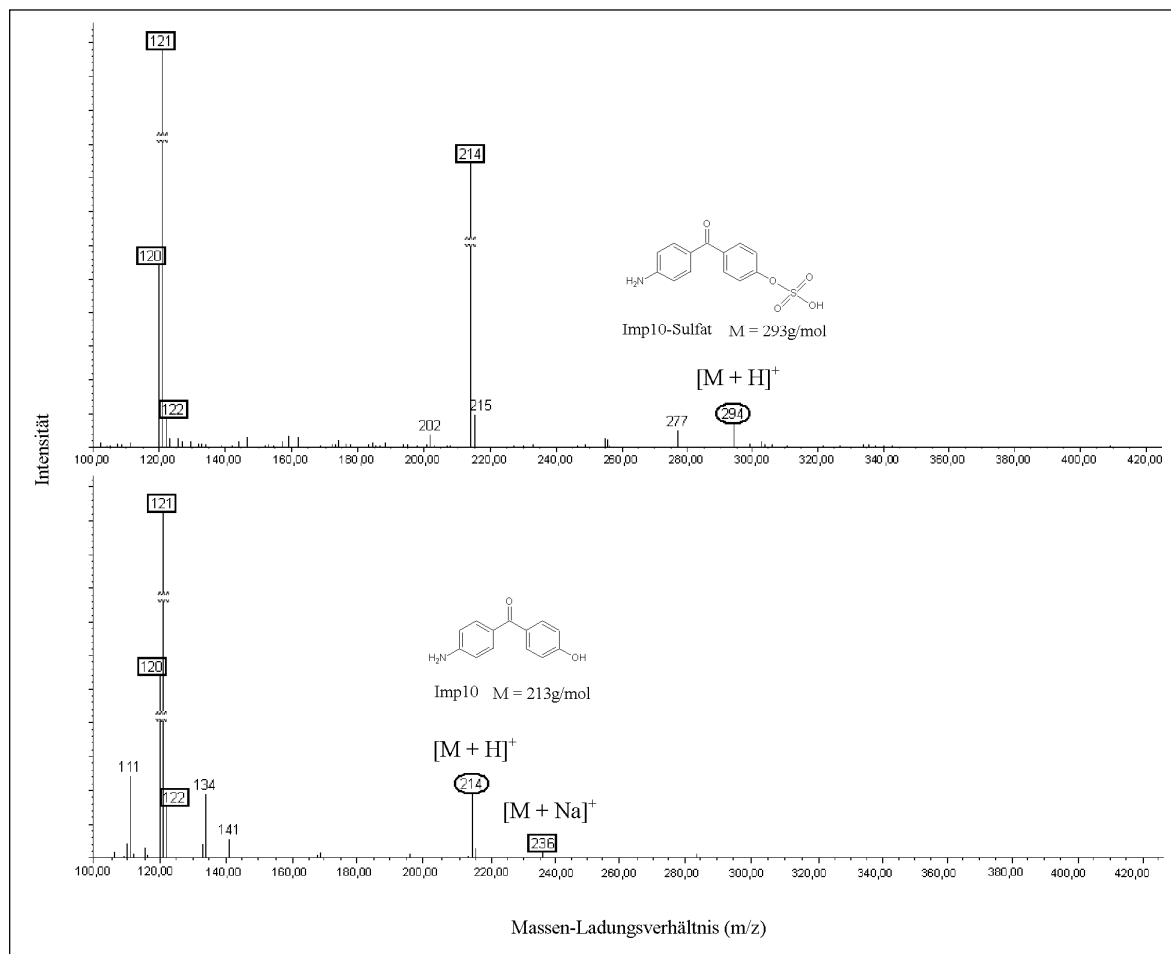


**Abb. 70** Oben: Massenspektrum von Plasma von Patient #01-09 15min nach Ende der Infusion, Retentionszeit 3,4min; Unten: Massenspektrum von Imp10-Glucuronid in wässriger Lösung

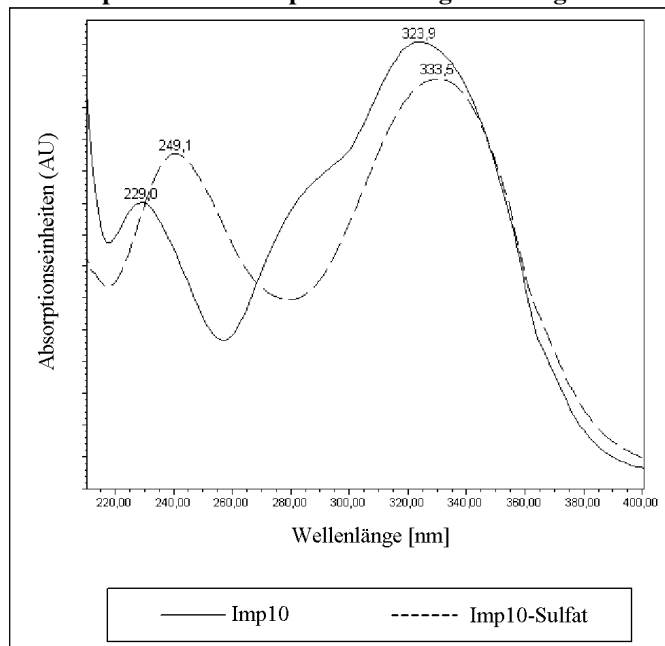


**Abb. 71** Links: Vergleich der Absorptionsspektren des gefundenen Peaks und hergestelltem Imp10-Glucuronid, Rechts: Vergleich der Retentionszeiten der Peaks im SIR214

### 9.1.3.2 Imp10-Sulfat



**Abb. 72** Oben: Massenspektrum von Urin von Patient #01-14, Retentionszeit 7,5min. Unten: Massenspektrum von Imp10 in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 1 µg/ml



**Abb. 73** Vergleich der Absorptionsspektren des gefundenen Peaks und Imp10

### 9.1.3.3 N-Acetyl-Imp10 Derivate

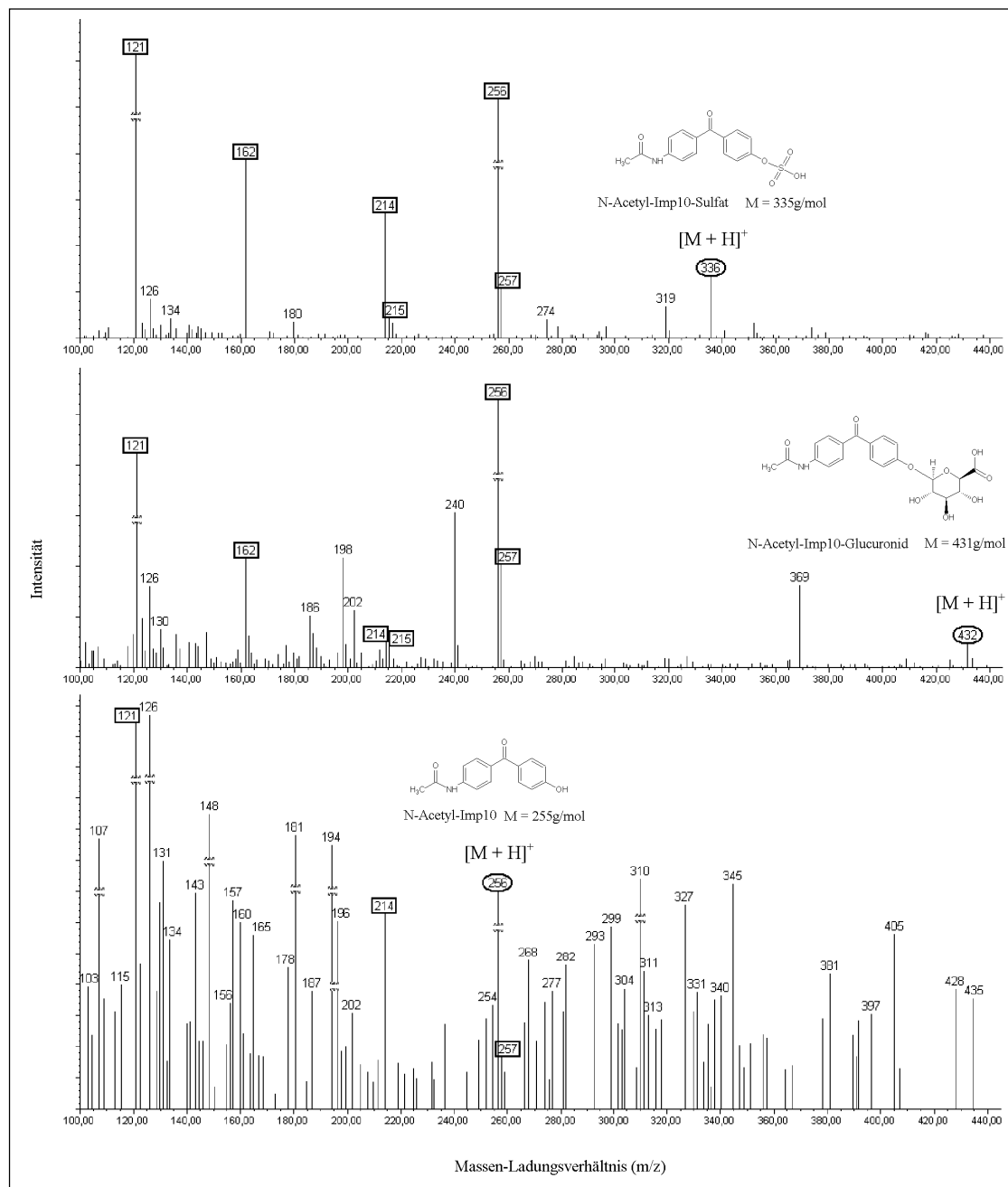


Abb. 74 Massenspektren von Urin von Patient #01-14 bei 10,4min (oben), 3,8min (Mitte) und 9,4min (unten)

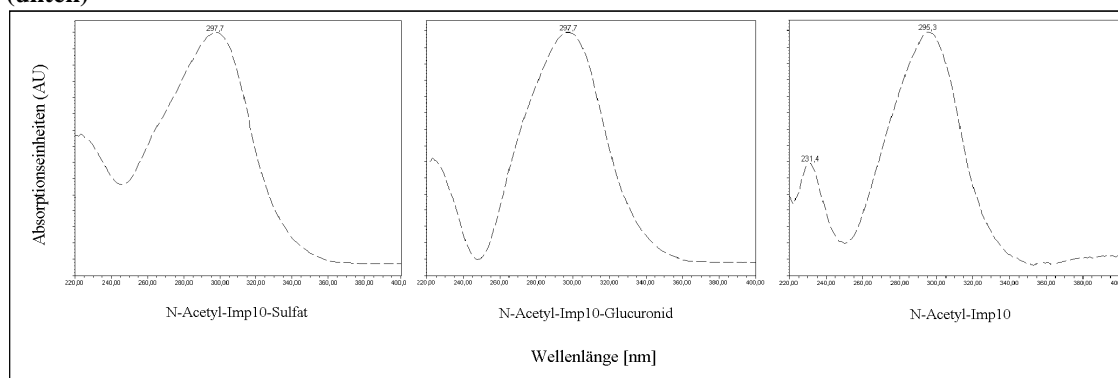


Abb. 75 Vergleich der Absorptionsspektren der drei N-acetylierten Imp10 Derivate

**Tab. 9.1 Im Rahmen der Studie mittels PDA und MS gemessene Tr-IN2755-Konzentrationen im Plasma [ng/ml]**

01-01	0.0	232.6	219.2	268.0	191.8	113.3	54.8	27.0	22.2	15.9	5.3	1.9	0.5	0.0
Patient														
01-02	0.0	320.7	444.0	483.8	515.4	445.3	163.3	92.8	57.0	54.8	21.8	4.7	1.1	0.3
02-01	0.0	527.5	700.2	861.4	883.1	380.5	194.7	124.9	90.5	35.3	21.2	4.0	LLQ	0.0
Patient	0h	30'	60'	90'	3:30h	5'	15'	30'	45'	1h	2h	4h	8h	24h
01-03	0.0	nIS	nIS	nIS	nIS	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIS
01-04	0.0	1654.3	2630.9	2616.7	2250.5	1264.4	693.6	n.b.	n.b.	191.1	59.7	19.6	2.7	0.0
01-05	0.0	2627.3	4278.6	4760.9	4747.3	7455.7	3309.6	2535.5	n.b.	1004.8	403.7	52.4	16.0	4.5
01-07	0.1	5242.8	9803.5	10715.1	14107.3	14148.9	9554.1	6237.1	3379.4	2379.0	1065.8	169.4	57.6	3.5
Patient	0h	30'	60'	90'	3:30h	5'	15'	30'	45'	1h	2h	4h	8h	24h
01-08	0.0	nIS	nIS	nIS	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIS
01-09	0.0	8165.0	26923.3	44815.6	56683.7	37987.9	26722.8	24132.5	8164.6	1570.5	114.7	7.3	5.9	8.6
01-10	0.0	12176.7	30600.6	41411.3	59319.2	35040.7	29035.6	17459.2	3843.6	371.7	124.5	2.7	3.5	2.7
01-11	0.1	14842.8	31373.8	49111.1	33190.4	28339.0	n.b.	15508.0	3433.6	739.1	56.1	5.4	5.9	4.7
01-12	0.0	18700.9	23510.6	13773.3	n.b.	n.b.	7144.2	n.b.	2217.2	499.9	143.3	3.8	3.4	6.6
01-13	0.0	30603.2	39024.7	31813.9	37118.7	20433.8	15651.0	12505.0	3560.7	898.7	321.3	11.1	9.0	7.8
01-14	0.0	8774.0	12304.7	15565.7	70418.9	44224.8	21623.7	12674.3	3207.0	258.6	101.9	6.3	4.4	3.3
01-15	0.0	1595.6	110167.2	31738.8	15246.0	11554.1	6134.7	5867.0	1473.0	334.5	124.3	8.6	9.2	7.2
01-16	0.0	9007.4	25396.5	31266.7	38348.3	36975.5	20357.3	7729.5	3028.2	242.8	497.6	8.9	11.4	n.b.
01-18	0.0	3142.6	6399.7	6627.3	4595.4	3928.3	1900.7	874.0	180.1	60.1	n.b.	48.8	6.0	1.6
01-19	0.0	3121.9	4236.8	4509.5	5108.9	2344.5	998.3	421.5	146.9	33.7	9.0	1.5	n.b.	1.4
01-20	0.0	16393.3	59800.7	91150.8	67473.4	n.b.	47251.7	35646.7	14518.3	4387.6	892.0	75.9	98.5	59.2
01-21	0.0	34777.2	83050.0	138697.7	173455.3	148719.2	128387.5	102603.4	50130.3	10809.1	2146.9	n.b.	92.6	79.7
01-22	0.0	4361.2	8576.0	8598.3	5195.5	4095.7	2483.4	1641.2	333.2	113.1	23.2	1.6	n.b.	0.4
01-25	0.0	8646.8	10193.6	13804.7	5175.0	3939.2	2822.5	1757.3	604.9	129.8	17.8	2.2	13.3	21.1
01-26	0.0	7698.0	13836.1	15648.2	12888.4	7844.9	2882.5	n.b.	1170.8	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
01-28	2.2	3500.3	8362.7	11596.7	8580.9	5747.6	4359.5	2851.4	551.2	195.6	50.7	3.0	2.4	2.5
01-29	0.0	4018.4	6084.1	6956.2	5631.5	2815.7	1374.9	1060.5	194.5	21.7	44.2	2.1	1.9	1.3
01-30	0.0	21431.1	59092.5	90538.5	122586.6	78034.9	42240.2	27590.1	4795.1	602.3	110.9	15.5	16.1	14.4
01-31	0.0	23983.6	72869.3	78104.9	74533.4	61139.0	37857.8	31562.4	5743.4	1063.0	269.9	n.b.	n.b.	n.b.
01-32	0.0	22606.7	125462.3	180792.4	173040.9	162077.4	n.b.	105889.4	39999.6	9355.7	172.0	35.1	33.7	44.2
01-33	0.0	8600.5	15819.5	14800.6	14942.0	8591.7	6106.3	3262.4	677.5	175.5	81.1	64.0	13.7	n.b.
01-34	0.0	6760.4	12203.6	14086.2	12556.7	n.b.	5434.6	4021.9	732.1	196.3	43.7	3.9	1.7	0.9
01-34	0.0	8769.3	16738.3	17955.3	16604.3	12803.2	8040.1	5807.3	824.8	228.8	0.0	0.0	0.0	0.0

## 9.2 Messwerte

### 9.2.1 Plasma

**Tab. 9.1 Im Rahmen der Studie mittels PDA und MS gemessene TrIN2755-Konzentrationen im Plasma [ng/ml]  
(Fortsetzung)**

Patient	0h	30'	90'	3:30h	5'	15'	30'	45'	2h	4h	8h	24h	25h	26h
		nIS	nIS	nIS	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIS
01-35	0,0	49699,6	83450,6	130011,1	112028,5	85994,3	64688,2	48720,9	15271,4	3456,0	597,8	154,5	146,6	135,4
01-36	0,2	11820,9	21578,4	24481,6	21828,7	20666,0	10597,8	7209,6	2102,8	359,7	54,5	5,2	4,0	2,3
01-37	0,0	7913,3	17663,9	21137,4	20212,2	13725,0	n.b.	3701,0	953,3	344,6	57,9	1,6	2,0	5,1
01-38	0,0	8075,3	23971,1	31637,8	27227,4	19487,3	13157,8	7457,0	2820,3	593,1	254,7	5,9	6,5	3,7
01-39	1,5	13271,0	24177,7	34256,6	24102,1	15215,8	12023,3	7201,8	2540,4	11733,9	162,8	8,9	8,8	8,1
01-40	2,8	19402,3	33249,3	42338,3	28724,7	20020,9	14915,2	8678,2	1597,5	318,2	75,8	14,0	10,2	11,7
01-41	0,0	14321,5	24567,3	25297,6	18690,1	10011,5	5063,1	3523,9	1227,1	173,5	51,3	5,7	5,7	5,4
01-42	0,0	18253,5	30595,2	35911,2	29949,6	16795,6	8013,8	2506,0	3106,8	438,6	31,7	13,4	6,3	6,1

**Tab. 9.2 Im Rahmen der Studie mittels PDA und MS gemessene Comp5-Konzentrationen im Plasma [ng/ml]**

Patient	0h	1h	2h	3h	5'	5'	15'	30'	45'	1h	2h	4h	8h	24h
					vIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIS
01-01	0,0	203,8	271,4	370,9	405,7	376,2	299,1	258,3	222,0	178,0	75,8	20,7	9,6	2,8

Patient	0h	30'	60'	90'	30'	5'	15'	30'	45'	1h	2h	4h	8h	24h
		nIS	nIS	nIS	vIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIS
01-02	0,0	71,9	300,7	457,6	774,7	797,3	526,6	479,3	403,1	350,8	180,0	101,2	31,2	1,3
02-01	LLQ	821,2	1682,9	2504,0	4044,4	4388,9	3975,4	4173,1	3492,8	2472,5	2012,8	886,5	242,1	13,6

Patient	0h	30'	60'	90'	3:30h	5'	15'	30'	45'	1h	2h	4h	8h	24h
		nIS	nIS	nIS	nIS	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIS
01-03	0,0	209,6	1863,1	3261,2	7184,4	7118,1	6926,9	5794,1	4401,7	3446,1	2443,1	1145,7	290,5	37,4
01-04	0,0	508,9	2682,3	4049,2	6822,8	7767,1	7407,6	n.b.	n.b.	4718,8	1791,2	941,4	270,6	36,8
01-05	0,1	475,0	2720,1	4308,3	8110,7	10920,2	11160,5	11338,6	n.b.	11721,9	7055,3	3275,8	2207,5	400,8
01-07	0,1	883,2	6750,7	11636,5	22069,3	26351,0	27018,4	26022,6	19154,2	18343,8	13376,8	6191,1	2781,2	301,1

Patient	0h	30'	90'	3:30h	5'	15'	30'	45'	2h	4h	8h	24h	25h	26h
		nIS	nIS	nIS	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIS
01-08	0,6	2351,4	17832,7	41459,8	47621,3	61277,9	61411,2	57713,7	58428,3	44235,2	17125,4	2537,5	2222,8	1881,5
01-09	0,1	3906,6	35455,8	68503,8	73599,0	86278,2	89099,1	86106,7	90133,7	43920,4	34953,0	1148,6	1222,5	808,0
01-10	4,2	2448,1	15742,8	34509,5	36278,7	40756,9	n.b.	37335,6	40797,2	23542,7	5832,4	766,7	532,6	529,9
01-11	0,3	5732,2	26809,4	39795,5	n.b.	n.b.	73696,8	n.b.	65473,3	44660,6	18000,3	2351,8	2067,7	1722,9
01-12	2,2	4718,5	29634,1	56234,6	56118,5	61380,8	64292,8	53825,4	60584,0	44951,1	29885,1	4041,4	4022,1	3336,2
01-13	0,0	4103,9	29989,3	58293,0	84928,2	103932,3	121773,0	115995,2	88636,9	56632,0	30481,2	4291,7	3528,7	3270,1
01-14	0,0	149,0	22002,4	52101,2	57706,7	52992,7	56828,0	49571,8	39478,1	17196,3	4735,8	1385,1	1101,1	1326,7
01-15	0,0	1731,6	21659,3	47412,4	62009,2	66713,4	66858,8	57511,6	51091,2	n.b.	28093,1	770,1	733,6	n.b.
01-16	LLQ	1720,6	12334,7	27754,1	30317,7	35645,7	33105,3	31520,3	25827,5	20023,1	n.b.	5911,6	949,0	723,9
01-18	0,0	1928,5	11872,6	18788,5	22587,5	22414,5	17098,4	10512,5	15550,8	9046,2	2909,7	99,4	85,7	82,4
01-19	0,0	3281,7	28228,1	66059,2	72323,7	n.b.	70017,9	74809,5	81675,6	70041,3	35744,0	7976,7	6340,8	5384,2

**Tab. 9.2 Im Rahmen der Studie mittels PDA und MS gemessene Comp5-Konzentrationen im Plasma [ng/ml]**  
**(Fortsetzung)**

Patient	0h	30'	90'	3:30h	5'	15'	30'	45'	2h	4h	8h	24h	25h	26h
	nIS	nIS	nIS	nIS	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIS
01-20	6,7	3403,8	33851,1	73609,5	87954,0	91174,8	89225,9	91367,6	94605,1	87185,5	48249,1	8212,3	6683,8	6756,5
01-21	0,0	891,9	4745,0	9674,2	9385,0	8106,0	8417,7	7472,6	4496,5	3053,6	1934,5	337,3	293,2	237,1
01-22	0,0	4993,6	11758,3	27383,0	30871,2	34001,4	31253,2	26637,2	25351,7	16791,8	9495,4	2552,8	2126,3	1979,6
01-25	0,0	1297,8	12930,9	25199,9	29033,2	27823,4	22819,6	n.b.	18839,2	1479,2	172,1	142,7	154,3	0,0
01-26	0,9	970,9	12120,7	28109,2	32363,6	35017,2	36132,4	31603,5	24275,2	15957,1	7707,1	671,9	493,7	465,0
01-28	3,8	1343,1	10575,7	21715,7	26723,1	23607,7	24281,5	25058,8	14594,9	3779,1	7849,9	258,0	214,8	213,5
01-29	0,0	4064,9	53185,9	108090,3	119223,4	128268,9	130048,7	136908,8	105813,6	67180,5	33029,6	5329,6	4846,2	4267,2
01-30	0,0	3891,6	31854,0	60104,6	60974,2	65393,6	63028,7	56597,3	42309,8	26299,7	7472,2	1081,6	974,7	867,2
01-31	3,0	1060,0	15473,9	25848,7	35796,0	39130,9	n.b.	46570,7	49339,2	52370,4	14298,4	11765,8	13296,9	10183,7
01-32	0,3	4052,1	23254,7	44005,8	49774,5	53493,9	55776,0	45196,9	33781,3	25518,3	13646,7	1933,0	1649,4	1309,3
01-33	0,0	2296,5	21525,1	33864,1	40437,7	n.b.	47367,4	39828,4	25811,8	18889,1	7079,0	952,5	838,7	633,1
01-34	0,0	1928,2	11697,5	25807,1	32238,9	29926,3	27698,0	26885,1	21208,6	26109,8	n.b.	4613,2	4189,4	4099,4
01-35	0,0	4078,8	16416,8	46231,9	55805,2	57846,3	59363,0	60224,0	55088,2	36219,3	23701,3	4484,7	3816,2	3454,3
01-36	0,2	4290,3	18576,2	35402,8	46016,9	55039,8	47055,5	35084,4	34604,7	22896,3	7289,8	1030,7	1044,6	1005,5
01-37	0,3	2356,2	22327,4	42915,3	52539,9	57581,4	n.b.	51637,0	48021,5	43923,7	18499,2	2311,8	2296,0	1826,0
01-38	1,1	3616,2	14381,8	31371,0	35726,0	32716,6	33280,7	31143,7	26422,9	22005,8	12235,7	1032,9	582,9	550,5
01-39	0,1	2366,7	21869,5	30163,5	47129,1	45357,1	41339,1	37809,0	38592,8	26720,1	15363,5	2305,5	2316,9	1741,6
01-40	2,7	8495,1	35885,0	60536,2	64419,6	66139,6	61386,3	62922,7	43231,0	33974,3	15571,1	990,1	695,7	627,7
01-41	1,2	6756,8	27882,4	59244,6	70084,4	67427,7	67522,4	67471,0	62359,5	33817,8	15877,8	2098,2	1902,3	1494,3
01-42	0,3	4821,1	7858,3	34749,5	40672,2	40627,9	39108,5	49786,0	33498,4	11114,2	5273,3	660,0	575,4	636,5

**Tab. 9.3 Im Rahmen der Studie mittels PDA und MS gemessene Comp4-Konzentrationen im Plasma [ng/ml]**

Patient	0h	1h	2h	3h	5'	5'	15'	30'	45'	1h	2h	4h	8h	24h
					vIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIS
01-01	0,0	203,8	271,4	370,9	405,7	376,2	299,1	258,3	222,0	178,0	75,8	20,7	9,6	2,8
Patient	0h	30'	60'	90'	30'	5'	15'	30'	45'	1h	2h	4h	8h	24h
		nIS	nIS	nIS	vIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIS
01-02	0,0	71,9	300,7	457,6	774,7	797,3	526,6	479,3	403,1	350,8	180,0	101,2	31,2	1,3
02-01	LIQ	821,2	1682,9	2504,0	4044,4	4388,9	3975,4	4173,1	3492,8	2472,5	2012,8	886,5	242,1	13,6
Patient	0h	30'	60'	90'	3:30h	5'	15'	30'	45'	1h	2h	4h	8h	24h
		nIS	nIS	nIS	nIS	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIS
01-03	0,0	209,6	1863,1	3261,2	7184,4	7118,1	6926,9	5794,1	4401,7	3446,1	2443,1	1145,7	290,5	37,4
01-04	0,0	508,9	2682,3	4049,2	6822,8	7767,1	7407,6	n.b.	n.b.	4718,8	1791,2	941,4	270,6	36,8
01-05	0,1	475,0	2720,1	4308,3	8110,7	10920,2	11160,5	11338,6	n.b.	11721,9	7055,3	3275,8	2207,5	400,8
01-07	0,1	883,2	6750,7	11636,5	22069,3	26351,0	27018,4	26022,6	19154,2	18343,8	13376,8	6191,1	2781,2	301,1
01-08	1,1	51,3	869,1	2811,0	3201,6	4069,9	4352,6	4335,7	4449,6	3260,8	1424,2	170,2	147,9	116,8

**Tab. 9.3 Im Rahmen der Studie mittels PDA und MS gemessene Comp4-Konzentrationen im Plasma [ng/ml]  
(Fortsetzung)**

Patient	0h	30'	90'	3:30h	5'	15'	30'	45'	2h	4h	8h	24h	25h	26h
	nIS	nIS	nIS	nIS	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIE	nIS
01-09	1,0	147,9	3188,6	7058,6	7244,4	8516,8	8610,5	8205,1	8297,1	4389,1	3343,4	123,2	117,4	92,6
01-10	0,6	70,7	1351,9	4113,6	4263,5	4398,2	n.b.	4249,4	4261,4	2319,4	378,2	33,4	19,1	17,8
01-11	0,3	158,8	2617,0	5140,7	n.b.	n.b.	5898,5	n.b.	5173,7	3889,3	1667,1	241,1	210,6	168,4
01-12	0,0	94,8	1561,8	3143,8	2729,4	2793,6	2614,6	2061,6	788,3	171,2	44,4	1,9	1,7	1,4
01-13	2,5	116,3	1977,1	3951,9	5444,0	7075,3	8263,6	8280,6	6812,6	4736,4	2743,9	406,3	286,4	267,3
01-14	1,3	3,0	1723,0	6082,0	6263,6	5932,4	6627,3	5965,2	4120,9	1799,0	453,3	82,2	70,5	73,3
01-15	0,0	21,4	1148,0	2897,4	3734,4	4076,9	4142,3	3532,1	3285,5	898,8	1740,3	20,3	17,9	0,0
01-16	0,0	35,8	810,4	2654,0	2803,7	3406,5	3229,1	3047,8	2611,8	2134,9	n.b.	329,5	58,2	41,0
01-18	0,0	42,3	710,3	1551,2	1731,6	1833,3	1626,8	1164,4	1299,8	830,3	226,8	22,6	20,3	19,9
01-19	0,0	58,9	1293,1	3588,9	3889,0	n.b.	4013,0	4361,8	4622,5	3853,7	2681,2	422,8	406,8	366,5
01-20	0,0	54,7	1671,2	4869,9	4986,2	5208,7	5101,1	5794,0	5819,5	5054,9	2655,8	355,2	321,5	305,0
01-21	0,0	14,9	208,3	519,5	516,2	485,6	512,7	475,4	301,5	164,3	69,3	21,4	19,0	15,3
01-22	0,0	195,2	863,7	3064,5	3655,5	4119,8	3738,8	3633,1	3297,2	2521,8	918,7	303,4	269,3	243,7
01-25	0,0	0,0	933,8	1547,3	1682,5	1752,6	1473,6	n.b.	1198,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
01-26	0,9	3,6	598,8	1909,1	2345,0	2555,4	2489,9	2250,8	2048,4	1440,2	585,1	38,0	25,5	24,8
01-28	1,8	25,5	535,0	1539,6	1794,3	1741,1	1911,7	2046,7	1546,7	516,1	804,7	131,4	155,8	136,5
01-29	19,0	27,2	3331,9	8982,3	9117,7	9372,5	9671,2	10503,1	8915,1	5523,1	2457,6	383,1	356,4	321,5
01-30	0,0	60,2	2221,1	4791,5	4959,1	5453,3	5385,9	4922,9	3833,6	2520,3	606,7	177,0	175,6	198,5
01-31	1,6	15,0	1065,2	1932,0	2536,3	2781,0	n.b.	3398,6	3390,0	3746,4	1286,3	919,2	1003,8	791,7
01-32	5,1	96,1	1173,7	3263,0	3604,4	3919,5	4347,2	4055,7	3384,4	2454,8	1460,3	134,6	141,4	112,1
01-33	5,8	66,3	1420,2	2802,2	3356,0	n.b.	2926,6	3775,3	2697,6	1777,9	815,6	70,5	53,0	38,8
01-34	0,0	21,5	640,7	2200,5	2882,4	2758,6	2583,0	2618,8	2397,9	1295,8	642,0	n.b.	n.b.	n.b.
01-35	0,0	41,3	375,4	2049,5	2461,6	2575,4	2612,8	2525,9	2633,0	1388,4	900,4	161,6	122,2	117,1
01-36	1,8	58,1	1006,6	2394,2	2774,7	3061,3	2885,0	2335,8	2226,1	1468,7	411,6	58,5	60,1	48,6
01-37	0,0	27,6	613,7	2402,9	2769,3	3060,8	n.b.	3110,1	2772,9	2396,9	972,4	77,1	64,3	47,3
01-38	0,0	201,5	1236,5	3640,1	3508,3	3338,8	3393,4	3233,9	2741,3	2382,2	954,1	63,0	52,2	43,4
01-39	5,8	51,0	1418,9	2312,3	3529,6	323,9	3536,2	3271,4	2897,7	1694,0	847,7	76,2	70,1	51,7
01-40	8,2	164,7	1940,6	4430,0	5064,6	5342,1	5167,8	5398,1	4620,7	2978,5	1307,6	72,3	56,3	44,3
01-41	1,2	76,2	778,8	2721,8	3157,1	3415,8	2822,6	3314,1	2600,9	1324,1	538,9	57,0	47,4	36,1
01-42	2,8	137,8	1036,5	2149,2	3267,5	2791,5	3084,7	4108,8	1733,5	1083,5	162,1	22,9	19,0	0,0



**Tab. 9.4 Im Rahmen der Studie mittels PDA und MS gemessene TrIN2755-Konzentrationen im Urin [%]**

Patient	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10	U11	U12	U13	U14	U15
01-01	0,00	4,66	4,77	4,78	4,79	4,79									
01-02	0,00	0,10	0,73	1,72	3,35	3,45	3,51	3,51	3,51	3,51	3,51				
02-01	0,00	1,01	3,14	3,24	3,24	3,24	3,24	3,90	3,90	3,90					
01-03	0,00	1,29	3,61	3,85	3,88	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90					
01-04	0,65	2,49	3,91	4,14	4,22	4,23	4,23	4,24	4,24	4,24	4,25	4,25	4,25	4,25	4,25
01-05	0,00	5,38	15,62	17,80	17,83										
01-07	9,67	11,52	11,54	11,56											
01-08	0,00	3,02	6,26	9,22	10,40	11,15	11,54	11,65	11,68	11,69	11,70	11,70	11,70		
01-09	0,00	1,08	3,16	4,91	6,09	7,11	8,15	8,37	8,74	9,23	9,30	9,39	9,41	9,43	
01-10	0,00	15,96	29,90	31,57	32,32	32,58	32,77	32,86	32,88	32,88	9,24				
01-11	0,00	0,00	2,31	4,07	7,53	8,68	9,12	9,19	9,24	9,24	9,24				
01-12	0,00	0,00	4,98	9,28	9,97	10,16	10,19	10,21	10,22						
01-13	0,00	0,00	1,83	3,96	6,15	9,24	12,90	13,96	14,28	14,43	14,47	14,49	14,50	14,50	14,50
01-14	0,00	0,00	1,32	4,82	8,74	13,80	15,96	16,41	16,54	16,61	16,65	16,68	16,69	16,69	16,69
01-15	0,00	0,00	10,79	16,33	16,77	16,84	16,87	16,88	16,89						
01-16	0,00	0,00	1,32	4,82	8,74	13,80	15,96	16,41	16,54	16,61	16,65	16,68	16,69	16,69	16,69
01-18	0,00	0,00	0,02	1,06	3,81	6,88	9,15	9,48	9,55	9,64	9,78	9,83	9,86	9,87	9,87
01-19	0,00	0,00	0,99	5,37	12,36	17,17	18,71	19,32	19,57	19,68	19,73	19,75	19,76		
01-20	0,00	0,00	4,99	10,71	11,80	12,37	12,67	12,73	12,75						
01-21	0,00	0,00	0,82	1,92	7,55	15,31	22,75	23,07	23,34	23,43	23,49	23,52	23,52	23,52	
01-22	0,00	0,00	2,17	13,53	13,60	13,64	13,64	13,64	12,81	12,81	12,82				
01-25	0,00	0,00	1,48	5,29	10,51	12,12	12,68	12,79							
01-26	0,00	0,00	11,29	11,53	11,56	11,56									
01-28	0,00	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.									
01-29	0,00	0,00	3,67	6,70	9,82	10,97	11,12	11,23	11,29	11,31	11,33				
01-30	0,01	0,02	2,38	5,34	9,33	11,67	12,44	12,61	12,71	12,76	12,78	12,79	12,80	12,80	
01-31	0,00	0,00	3,18	10,23	16,36	20,09	21,75	22,36	22,57	22,58					
01-32	0,00	5,34	5,66	5,70	5,70	5,70									
01-33	2,75	3,14	8,79												
01-34	0,00	10,10	10,70	10,95	11,00	12,81	12,82								
01-35	0,00	6,28	14,70	20,91	23,16	23,87	24,28	24,44							
01-36	0,00	6,98	25,67	35,39	35,71	35,73									
01-37	0,00	5,62	11,12	11,67	11,72	11,73									
01-38	0,00	4,25	10,70	13,52	14,13	14,27	14,32	14,32							
01-39	0,00	4,66	8,42	8,53	8,56	8,59	8,59	8,60							
01-40	0,00	2,17	5,40	5,67	5,69	5,70	5,77	5,77							
01-41	0,00	0,59	2,70	6,08	9,27	13,35	16,78	18,23	18,44	18,51					
01-42	0,00	0,00	0,99	3,33	8,32	10,67	15,67	18,11	18,33	18,34					

## 9.2.2 Urin

## 9.3 Pharmakokinetikdaten

### 9.3.1 TriN2755

**Tab. 9.5 Für TriN2755 berechnete Pharmakokinetikparameter**

Patient	AUC [ng/ml x h]	C <sub>max</sub> [ng/ml]	t <sub>1/2</sub> [h]	MRT [h]	V <sub>c</sub> [l]	V <sub>ss</sub> [l]	CL <sub>tot</sub> [ml/min]	CL <sub>R</sub> [ml/min]	%Ae [%]
01-01	853,0	228,0	1,99	2,31	1,67	7,7	478,0	91,600	4,79
01-02	1.910,0	470,0	2,24	2,53	4,07	11,7	435,0	30,700	3,52
02-01	3.510,0	882,0	1,45	2,25	1,65	7,2	475,0	15,500	3,25
01-03	4.800,0	1.250,0	2,88	2,46	13,90	23,2	695,0	13,700	3,94
01-04	9.040,0	2.250,0	1,28	2,33	8,99	15,4	737,0	7,840	4,25
01-05	24.200	5.300,0	7,91	3,16	11,60	22,7	552,0	12,300	17,90
01-07	48.200	12.000	5,57	2,80	19,50	25,8	553,0	4,010	11,60
01-08	188.000	44.300	7,53	3,60	22,40	22,9	284,0	1,050	11,90
01-09	163.000	40.100	5,68	3,02	13,60	15,3	326,0	0,972	9,53
01-10	152.000	36.600	9,12	3,00	15,20	18,2	352,0	3,620	32,90
01-11	110.000	30.000	5,69	2,63	14,20	19,1	364,0	1,440	9,47
01-12	203.000	45.100	7,27	3,01	10,60	16,6	329,0	0,842	10,20
01-13	44.300	13.400	2,90	2,28	2,16	13,9	565,0	2,040	14,50
01-14	191.000	119.000	3,27	1,75	1,17	8,2	305,0	1,270	16,70
01-15	114.000	31.100	2,43	2,88	4,56	23,7	586,0	1,990	13,60
01-16	27.000	6.580,0	4,01	2,62	11,50	17,1	494,0	10,400	16,90
01-18	14.400	4.250,0	5,52	2,21	8,69	17,9	730,0	8,980	9,84
01-19	354.000	91.700	4,18	3,29	9,97	17,8	235,0	0,923	19,60
01-20	718.000	144.000	3,42	3,88	1,68	10,6	116,0	0,300	12,90
01-21	34.000	2.390,0	3,22	2,83	1,09	8,7	392,0	11,600	23,70
01-22	100.000	8.730,0	10,50	0,89	2,36	8,7	400,0	4,600	13,80
01-25	64.500	15.600	2,41	2,70	8,46	12,8	310,0	3,320	12,80
01-26	58.500	11.400	2,54	3,32	7,71	16,0	342,0	3,360	11,80
01-28	27.100	1.640,0	4,14	2,71	2,19	11,6	739,0	n.a.	n.a.
01-29	361.000	89.400	4,94	2,84	4,47	7,1	277,0	0,529	11,50
01-30	304.000	73.300	5,39	3,01	13,00	15,3	329,0	0,696	12,70
01-31	723.000	179.000	4,67	3,30	8,12	8,4	138,0	0,503	21,80
01-32	61.700	14.900	5,50	2,85	10,70	20,6	459,0	1,560	5,79
01-33	57.500	14.100	5,67	2,80	20,00	23,7	493,0	n.a.	n.a.
01-34	73.700	18.000	4,08	2,86	13,50	18,6	385,0	n.a.	n.a.
01-35	541.000	130.000	6,60	3,18	2,02	12,2	185,0	0,745	24,20
01-36	99.700	24.500	2,97	2,85	2,33	15,8	401,0	5,930	35,40
01-37	85.800	20.800	8,28	2,73	10,90	15,7	466,0	2,280	11,80
01-38	131.000	30.600	2,68	3,06	14,80	17,3	306,0	1,840	14,40
01-39	137.000	33.400	3,11	2,80	3,83	13,4	291,0	1,050	8,67
01-40	148.000	36.500	5,09	2,71	11,10	14,4	337,0	0,648	5,77
01-41	101.000	25.000	4,10	2,54	9,28	15,9	493,0	3,070	18,70
01-42	138.000	33.900	14,50	2,70	5,66	13,7	361,0	2,230	18,50

### 9.3.2 Comp5

**Tab. 9.6 Für Comp5 berechnete  
Pharmakokinetikparameter**

	AUC	Cmax	t <sub>1/2</sub>	MRT
Patient	[ng/ml x h]	[ng/ml]	[h]	[h]
01-01	853,0	228,0	1,99	2,31
01-02	1.910,0	470,0	2,24	2,53
02-01	3.510,0	882,0	1,45	2,25
01-03	4.800,0	1.250,0	2,88	2,46
01-04	9.040,0	2.250,0	1,28	2,33
01-05	24.200	5.300,0	7,91	3,16
01-07	48.200	12.000	5,57	2,80
01-08	188.000	44.300	7,53	3,60
01-09	163.000	40.100	5,68	3,02
01-10	152.000	36.600	9,12	3,00
01-11	110.000	30.000	5,69	2,63
01-12	203.000	45.100	7,27	3,01
01-13	44.300	13.400	2,90	2,28
01-14	191.000	119.000	3,27	1,75
01-15	114.000	31.100	2,43	2,88
01-16	27.000	6.580,0	4,01	2,62
01-18	14.400	4.250,0	5,52	2,21
01-19	354.000	91.700	4,18	3,29
01-20	718.000	144.000	3,42	3,88
01-21	34.000	2.390,0	3,22	2,83
01-22	100.000	8.730,0	10,50	0,89
01-25	64.500	15.600	2,41	2,70
01-26	58.500	11.400	2,54	3,32
01-28	27.100	1.640,0	4,14	2,71
01-29	361.000	89.400	4,94	2,84
01-30	304.000	73.300	5,39	3,01
01-31	723.000	179.000	4,67	3,30
01-32	61.700	14.900	5,50	2,85
01-33	57.500	14.100	5,67	2,80
01-34	73.700	18.000	4,08	2,86
01-35	541.000	130.000	6,60	3,18
01-36	99.700	24.500	2,97	2,85
01-37	85.800	20.800	8,28	2,73
01-38	131.000	30.600	2,68	3,06
01-39	137.000	33.400	3,11	2,80
01-40	148.000	36.500	5,09	2,71
01-41	101.000	25.000	4,10	2,54
01-42	138.000	33.900	14,50	2,70

### 9.3.3 Comp4

**Tab. 9.7 Für Comp4 berechnete  
Pharmakokinetikparameter**

	AUC	Cmax	t <sub>1/2</sub>	MRT
Patient	[ng/ml x h]	[ng/ml]	[h]	[h]
01-01	38,4	14,2	5,33	3,34
01-02	165,0	46,1	5,33	3,43
02-01	1.220,0	235,0	5,47	4,80
01-03	2.590,0	460,0	9,96	6,41
01-04	3.080,0	674,0	3,44	4,83
01-05	7.000,0	1000,0	7,21	6,76
01-07	16.100	3040,0	1,73	5,22
01-08	41.400	4470,0	5,67	9,00
01-09	71.900	8010,0	10,00	7,77
01-10	31.200	4410,0	8,94	6,43
01-11	54.900	5560,0	5,44	8,42
01-12	51.000	5060,0	7,32	8,68
01-13	26.500	3600,0	4,62	7,15
01-14	31.100	5870,0	5,35	6,06
01-15	26.200	9600,0	4,80	3,59
01-16	27.400	3240,0	3,18	7,69
01-18	9.720,0	1750,0	5,79	6,07
01-19	55.000	4580,0	12,40	13,00
01-20	65.200	5800,0	3,41	9,60
01-21	3.420,0	534,0	7,00	8,61
01-22	6.420,0	801,0	8,77	10,80
01-25	10.100	1700,0	2,31	4,96
01-26	21.800	2450,0	3,23	7,73
01-28	19.900	1870,0	6,20	10,70
01-29	87.200	9610,0	10,30	9,33
01-30	37.300	5250,0	8,66	8,47
01-31	64.300	3710,0	4,64	13,50
01-32	37.500	3990,0	16,60	9,98
01-33	27.600	3770,0	6,34	7,43
01-34	35.200	3510,0	6,90	10,60
01-35	23.300	2560,0	4,98	9,49
01-36	21.500	2820,0	9,64	7,71
01-37	27.400	3040,0	8,06	8,19
01-38	26.600	3580,0	3,43	6,93
01-39	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
01-40	43.300	5120,0	3,89	7,17
01-41	23.800	3340,0	4,38	7,12
01-42	18.400	3500,0	4,23	5,55

## 9.4 Statistik

### 9.4.1 Normierte Fläche unter der Kurve

**Tab. 9.8 Auf Dosis/Körpergewicht normierte AUC der männlichen Patienten**

	Gewicht	Dosis	Dosis/KG	AUC(TriN) / Dosis/KG	AUC(Comp5) / Dosis/KG	AUC(Comp4) / Dosis/KG
Patient	[kg]	[mg]	[mg/kg]	[mg/ml x h]	[mg/ml x h]	[mg/ml x h]
01-01	73,0	25	0,3	2490,8	4467,6	112,1
01-05	73,0	800	11,0	2208,3	7738,0	638,8
01-21	83,0	800	9,6	3527,5	7615,3	354,8
01-22	77,5	1200	15,5	6458,3	3700,6	414,6
01-26	86,0	1200	14,0	4192,5	21356,7	1562,3
01-28	113,0	1200	10,6	2551,9	14501,7	1873,9
01-32	86,0	1700	19,8	3121,3	21955,3	1897,1
01-33	93,0	1700	18,3	3145,6	17505,9	1509,9
01-36	88,0	2400	27,3	3655,7	15143,3	788,3
01-37	82,0	2400	29,3	2931,5	18108,3	936,2
01-40	66,0	3000	45,5	3256,0	12056,0	952,6
01-41	108,0	3000	27,8	3636,0	20808,0	856,8
01-42	83,0	3000	36,1	3818,0	7580,7	509,1
01-08	75,0	3200	42,7	4406,3	13406,3	970,3
01-10	65,0	3200	49,2	3087,5	6418,8	633,8
01-13	85,0	4000	47,1	941,4	7055,0	563,1
01-15	87,5	5000	57,1	1995,0	7472,5	458,5
01-19	100,0	5000	50,0	7080,0	19180,0	1100,0
01-20	86,0	5000	58,1	12349,6	19952,0	1121,4
01-29	94,0	6000	63,8	5655,7	17546,7	1366,1
01-30	80,0	6000	75,0	4053,3	5760,0	497,3
01-35	82,0	6000	73,2	7393,7	8241,0	318,4

**Tab. 9.9 Auf Dosis/Körpergewicht normierte AUC der weiblichen Patienten**

	Gewicht	Dosis	Dosis/KG	AUC(TriN) / Dosis/KG	AUC(Comp5) / Dosis/KG	AUC(Comp4) / Dosis/KG
Patient	[kg]	[mg]	[mg/kg]	[mg/ml x h]	[mg/ml x h]	[mg/ml x h]
01-02	58	50	0,9	2215,6	3839,6	191,4
02-01	64	100	1,6	2246,4	14784,0	780,8
01-03	55,7	200	3,6	1336,8	9051,3	721,3
01-04	98	400	4,1	2214,8	8893,5	754,6
01-16	63	800	12,7	2126,3	22916,3	2157,8
01-18	99,5	800	8,0	1791,0	16666,3	1208,9
01-25	72	1200	16,7	3870,0	6900,0	606,0
01-07	91	1600	17,6	2741,4	8474,4	915,7
01-34	60	1700	28,3	2601,2	13976,5	1242,4
01-11	93,6	2400	25,6	4290,0	24843,0	2141,1
01-38	48,5	2400	49,5	2647,3	6082,7	537,5
01-39	67,5	2400	35,6	3853,1	n.a.	n.a.
01-09	52,1	3200	61,4	2653,8	12390,0	1170,6
01-12	93	4000	43,0	4719,8	16670,3	1185,8
01-14	68,3	4000	58,6	3261,3	5071,3	531,0
01-31	75,5	6000	79,5	9097,8	10947,5	809,1

## 9.4.2 Normierte maximale Konzentration

**Tab. 9.10 Auf Dosis/Körpergewicht normierte  $C_{\max}$  der männlichen Patienten**

	Gewicht	Dosis	Dosis/KG	$C_{\max}$ (TriN) / Dosis/KG	$C_{\max}$ (Comp5) / Dosis/KG	$C_{\max}$ (Comp4) / Dosis/KG
Patient	[kg]	[mg]	[mg/kg]	[mg]	[mg]	[mg]
01-01	73,0	25	0,3	665,8	1261,4	41,5
01-05	73,0	800	11,0	483,6	912,5	91,3
01-21	83,0	800	9,6	248,0	1037,5	55,4
01-22	77,5	1200	15,5	563,8	416,6	51,7
01-26	86,0	1200	14,0	817,0	2522,7	175,6
01-28	113,0	1200	10,6	154,4	2551,9	176,1
01-32	86,0	1700	19,8	753,8	21955,3	201,8
01-33	93,0	1700	18,3	771,4	2489,1	206,2
01-36	88,0	2400	27,3	898,3	1675,7	103,4
01-37	82,0	2400	29,3	710,7	18518,3	103,9
01-40	66,0	3000	45,5	803,0	1399,2	112,6
01-41	108,0	3000	27,8	900,0	2433,6	120,2
01-42	83,0	3000	36,1	937,9	1203,5	96,8
01-08	75,0	3200	42,7	1038,3	1272,7	104,8
01-10	65,0	3200	49,2	743,4	759,7	89,6
01-13	85,0	4000	47,1	284,8	1034,9	76,5
01-15	87,5	5000	57,1	544,3	981,8	168,0
01-19	100,0	5000	50,0	1834,0	1604,0	91,6
01-20	86,0	5000	58,1	2476,8	1622,0	99,8
01-29	94,0	6000	63,8	1400,6	1927,0	150,6
01-30	80,0	6000	75,0	977,3	841,3	70,0
01-35	82,0	6000	73,2	1776,7	807,7	35,0

**Tab. 9.11 Auf Dosis/Körpergewicht normierte  $C_{\max}$  der weiblichen Patienten**

	Gewicht	Dosis	Dosis/KG	$C_{\max}$ (TriN) / Dosis/KG	$C_{\max}$ (Comp5) / Dosis/KG	$C_{\max}$ (Comp4) / Dosis/KG
Patient	[kg]	[mg]	[mg/kg]	[mg]	[mg]	[mg]
01-02	58	50	0,9	545,2	790,0	53,5
02-01	64	100	1,6	564,5	2592,0	150,4
01-03	55,7	200	3,6	348,1	1974,6	128,1
01-04	98	400	4,1	551,3	2342,2	165,1
01-16	63	800	12,7	518,2	2795,6	255,2
01-18	99,5	800	8,0	528,6	4639,2	217,7
01-25	72	1200	16,7	936,0	1674,0	102,0
01-07	91	1600	17,6	682,5	1507,2	172,9
01-34	60	1700	28,3	635,3	1154,1	123,9
01-11	93,6	2400	25,6	1170,0	2632,5	216,8
01-38	48,5	2400	49,5	618,4	701,2	72,3
01-39	67,5	2400	35,6	939,4	n.a.	n.a.
01-09	52,1	3200	61,4	652,9	1323,7	130,4
01-12	93	4000	43,0	1048,6	1388,0	117,6
01-14	68,3	4000	58,6	2031,9	899,9	100,2
01-31	75,5	6000	79,5	2252,4	665,7	46,7

9.5 Patienten

9.5.1 Zeitlicher Ablauf der Studie

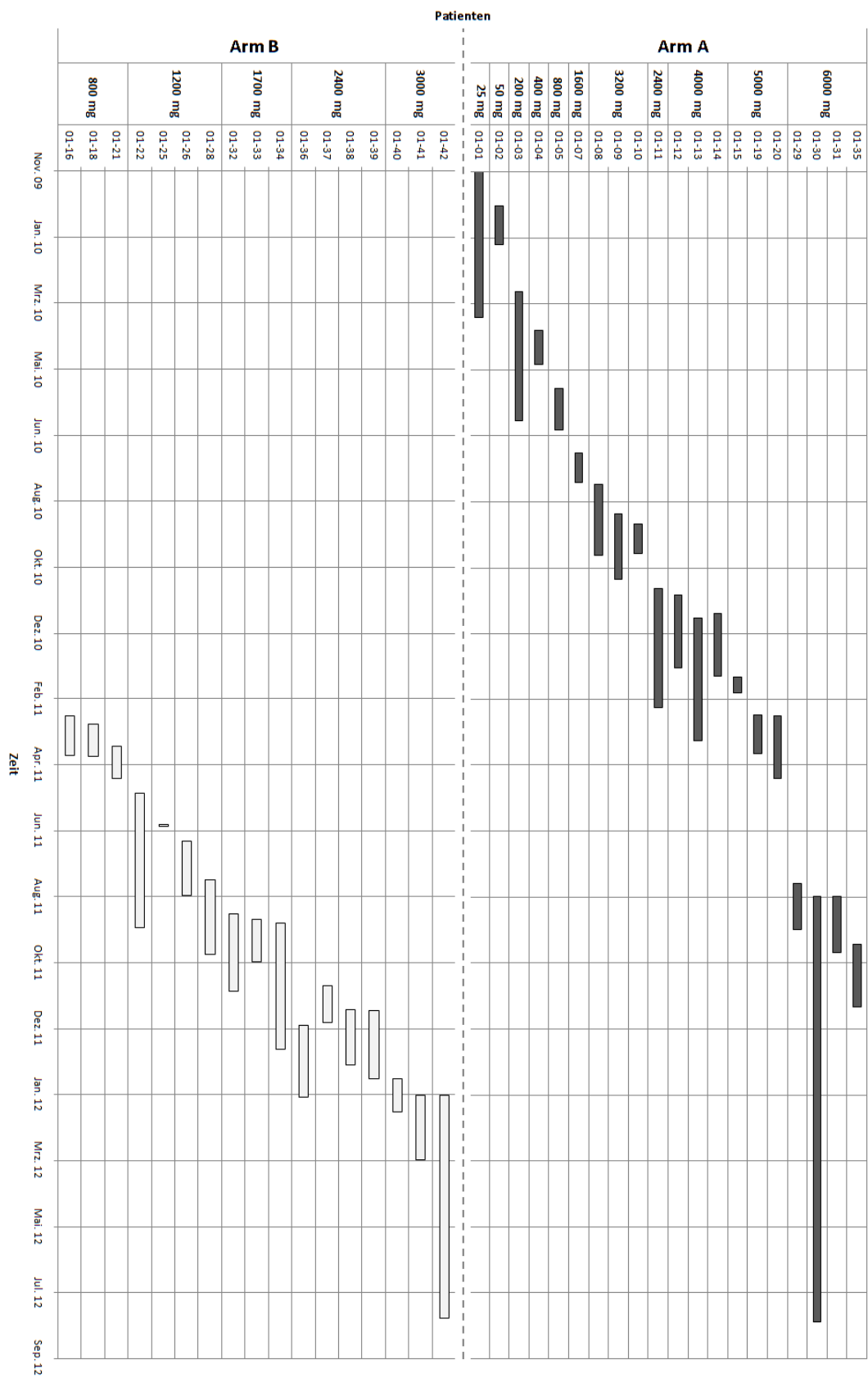


Abb. 76 Darstellung der Teilnahmezeiträume der einzelnen Patienten getrennt nach Arm A (oben) und Arm B (unten)

## **10 Danksagung**

Herrn Prof. Scheulen für die Überlassung des interessanten Themas und die fortwährende Unterstützung.

Herrn Prof. Fischer und Herrn Prof. Hohlfeld für die konstruktive Kritik und die Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Prof. Schuler für die Möglichkeit diese Arbeit im Westdeutschen Tumorzentrum trotz schwieriger Umstände zu Ende zu führen.

Herrn Dr. Hilger für die Einführung in den experimentellen Teil dieser Arbeit und die gute Betreuung vor Ort sowie die stete Ansprechbarkeit und die konstruktiven Gespräche.

Frau Dr. Richly dafür, dass sie als wichtiges Bindeglied zwischen Patienten und Studienlabor stets mit aktuellen Informationen weiterhelfen konnte, für die hilfreichen Anmerkungen beim Verfassen dieser Arbeit und die vielen Einblicke in die klinische Onkologie.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe "Pharmakologie antineoplastischer Substanzen" für die freundliche Unterstützung, besonders Nina Lüscher für die konstruktiven Gespräche und Matthias Grubert für das Synthetisieren der glucuronidierten Referenzsubstanzen und dafür, dass er bei der HPLC-Analytik stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Dem Phase-I-Studenten team der Station WTZ 2 und besonders Cordula Derks für die gute Zusammenarbeit sowohl während des experimentellen Teils als auch während des Schreibens dieser Arbeit.

Herrn Möllers für das Korrekturlesen von Teilen dieser Arbeit.

Meiner Familie, die mit ihren gelegentlichen Nachfragen für anhaltende Motivation sorgte und meiner Frau Andrea für den stetigen Rückhalt, ohne den diese Arbeit nicht hätte entstehen können.



## **A Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## B Publikationsliste

Teile der vorliegenden Doktorarbeit sind in folgende Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge eingegangen.

### Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

---

Wegener T., Lütcher N., Richly H., Ludwig G., Scheulen M. E., Hilger R. A.: *Quantification of TriN2755 and metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry in combination with UV-detection*. Submitted.

### Tagungsbeiträge - Poster

---

Hilger R. A., Wegener T., Richly H., Ludwig G., Mross K., Scheulen M. E.: *An ongoing phase I dose-escalation study with pharmacokinetics (PK) of TriN 2755 in patients with advanced solid tumors: A study in cooperation with the Central European Society for Anticancer Drug Research (CESAR-EWIV) - UPDATE*. CESAR Annual Meeting 2012, 28.-30.06.2012, Essen, Deutschland

Lütcher N., Wegener T., Hönes S., Richly H., Ludwig G., Scheulen M. E., Hilger R. A.: *Antitumor in vitro activity of TriN2755 and its metabolites/derivatives*. CESAR Annual Meeting 2012, 28.-30.06.2012, Essen, Deutschland

Hilger R. A., Wegener T., Richly H., Ludwig G., Mross K., Scheulen M. E.: *An ongoing phase I pharmacokinetic (PK) study of the safety and tolerability of TriN 2755 in patients with advanced solid tumors: A study in cooperation with the Central European Society for Anticancer Drug Research (CESAR-EWIV)*. CESAR Annual Meeting 2011, 16.-18.06.2011, Greifswald, Deutschland

Hilger R. A., Wegener T., Richly H., Ludwig G., Mross K., Scheulen M. E.: *A phase I dose-escalation study with pharmacokinetics (PK) of TriN 2755 in patients with advanced solid tumors: A study in cooperation with the Central European Society for Anticancer Drug Research (CESAR-EWIV)*. AACR 102nd Annual Meeting 2011, 02.-06.04.2011, Orlando, USA

## C Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Untersuchung des Metabolismus und der Pharmakokinetik des neuen Triazens TriN2755 in einer klinischen Phase-I-Studie*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Tobias Wegener befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Max E. Scheulen

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Tobias Wegener

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

Tobias Wegener